

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Herpesvirusspezifische T-Zellen für die Immuntherapie:
Von ihrer Identifikation zum Transfer ihrer Spezifität**

Andrea Schub

aus

Bogen

2009

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt betreut und von Herrn Prof. Dr. Horst Domdey vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Die Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 15.12.2009

Andrea Schub

Dissertation eingereicht am 15.12.2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt

2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am 18.03.2009

Im Rahmen meiner Arbeit haben sich folgende Publikationen ergeben:

Schub, A., Schuster, I. G., Hammerschmidt, W., Moosmann, A. CMV-specific TCR-transgenic T cells for immunotherapy. J. Immunol. 2009 Nov 15; 183(10):6819-30.

Schub, A., Dillinger, S., Martin, L., Moosmann, A. Target antigens of the HHV-6-specific CD8⁺ T-cell response. In preparation.

Liang, X., Weigand, L. U., Schuster, I. G., Eppinger, E., van der Griendt, J. C., Schub, A., Leisegang, M., Sommermeyer, D., Anderl, F., Han, Y., Ellwart, J., Moosmann, A., Busch, D. H., Uckert, W., Peschel, C., Krackhardt, A. M. A single T cell receptor (TCR) α -chain with dominant peptide recognition in the allo-restricted HER2/neu-specific T cell repertoire. J. Immunol. 2010 Feb 1;184(3):1617-29.

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	DAS IMMUNSYSTEM	3
2.2	DIE PRÄSENTATION VON ANTIGENEN AUF HLA-MOLEKÜLEN	4
2.3	DER T-ZELLREZEPTOR	6
2.4	DIE FAMILIE DER HERPESVIREN	8
2.5	EBV ALS WERKZEUG ZUR HERSTELLUNG VON ANTIGENPRÄSENTIERENDEN ZELLEN	10
2.6	CMV UND DIE SPEZIFISCHE IMMUNITÄT	12
2.7	TRANSFER CMV-SPEZIFISCHER T-ZELLREZEPTOREN ZUR THERAPIE VON CMV-ASSOZIIERTEN KOMPLIKATIONEN NACH ALLO-KMT.....	14
2.8	HHV-6 UND DIE SPEZIFISCHE IMMUNITÄT	15
2.9	AUFGABENSTELLUNG	18
3	MATERIAL	21
3.1	BAKTERIEN	21
3.2	PRIMÄRE ZELLEN UND ZELLINIEN	21
3.3	VIREN	23
3.4	PLASMIDE	23
3.5	OLIGONUKLEOTIDE	24
3.5.1	<i>Primer zur Analyse von B-Zelllinien auf Anwesenheit von EBV-Sequenzen</i>	<i>24</i>
3.5.2	<i>Primer zur Charakterisierung des TCR-Repertoires</i>	<i>25</i>
3.5.3	<i>Primer zur Klonierung der TCRα- und TCRβ-Gene in den retroviralen Vektor MP71Gpre</i>	<i>26</i>
3.5.4	<i>Primer zur Klonierung der HHV-6B-Gene U11 und U54 in den Vektor pCMV2-FLAG</i>	<i>27</i>
3.6	PEPTIDE	27
3.7	ANTIKÖRPER UND PEPTID/HLA-MULTIMERE	29
3.8	KITS	30
3.9	SONSTIGE REAGENZIEN	30
3.10	DIENTLEISTUNGEN	31
3.11	COMPUTERPROGRAMME UND INTERNETSEITEN	31
3.12	VERBRAUCHSMATERIAL	32
3.13	GERÄTE	32
4	METHODEN	33
4.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	33
4.1.1	<i>Allgemeines</i>	<i>33</i>
4.1.2	<i>Analyse von B-Zelllinien auf Anwesenheit von EBV-Sequenzen</i>	<i>33</i>
4.1.3	<i>Analyse des T-Zellrezeptors</i>	<i>34</i>
4.1.4	<i>Klonierung des T-Zellrezeptors in den retroviralen Vektor MP71Gpre</i>	<i>34</i>
4.1.5	<i>Klonierung der HHV-6B-Gene U11 und U54 in den Expressionsvektor pCMV2-FLAG</i>	<i>35</i>
4.2	ZELLKULTURMETHODEN	36
4.2.1	<i>Allgemeines</i>	<i>36</i>
4.2.2	<i>Isolation von primären humanen Lymphozyten</i>	<i>37</i>
4.2.3	<i>Herstellung polyklonaler T-Zelllinien</i>	<i>38</i>
4.2.4	<i>Herstellung monoklonaler T-Zelllinien</i>	<i>39</i>

4.2.5	Phänotypisierung von Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	40
4.2.6	Magnetische Separation von Zellpopulationen.....	40
4.2.7	ELISA zur Quantifizierung von Zytokinen	41
4.2.8	ELISpot zur Quantifizierung IFN- γ -sezernierender Zellen.....	42
4.2.9	Zytotoxizitätsanalyse	42
4.3	RETROVIRALER TCR-TRANSFER	42
4.3.1	Herstellung von Retroviruspartikeln	42
4.3.2	Transduktion von T-Zellen	43
4.3.3	Restimulation der TCR-transduzierten Zellen.....	43
4.4	INFEKTION VON ZELLEN MIT HHV-6	44
5	ERGEBNISSE	45
5.1	HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON CMV-SPEZIFISCHEN TCR-TRANSGENEN T-ZELLEN FÜR DIE IMMUNOTHERAPIE	45
5.1.1	Generierung von CMV-spezifischen T-Zellklonen	45
5.1.2	Charakterisierung der Reaktivität und Spezifität der hergestellten pp65- und IE-1-spezifischen T-Zellklone.....	48
5.1.3	Retroviraler Transfer der CMV-spezifischen TCRs in TCR $\alpha\beta$ -defiziente T-Zelllinien	58
5.1.4	Retroviraler Transfer der CMV-TCRs in primäre T-Zellen CMV-seronegativer Spender.....	59
5.1.5	Expansion und Anreicherung TCR-transgener T-Zellen mittels antigenspezifischer Stimulation	61
5.1.6	Reaktivität CMV-TCR-transgener T-Zellen nach antigenspezifischer und nicht-spezifischer Stimulation	65
5.1.7	Gedächtnis-Phänotyp CMV-TCR-transgener T-Zellen	68
5.2	GENERIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON HHV-6-SPEZIFISCHEN T-ZELLEN	70
5.2.1	Auswahl von Peptiden als HHV-6-Epitopkandidaten	70
5.2.2	Etablierung eines Stimulationsprotokolls für die Anreicherung von HHV-6-spezifischen T-Zellen	72
5.2.3	Charakterisierung der HHV-6-spezifischen T-Zellklone.....	89
5.2.4	Analyse der Häufigkeit HHV-6-epitopspezifischer T-Zellen im Blut von gesunden HHV-6-positiven Spendern	103
6	DISKUSSION	105
6.1	CMV-SPEZIFISCHE TCR-TRANSGENE T-ZELLEN FÜR DIE IMMUNOTHERAPIE	105
6.2	HHV-6-SPEZIFISCHE T-ZELLEN	115
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	123
8	ABKÜRZUNGEN.....	133

1 Zusammenfassung

Die Reaktivierung von Herpesviren, wie EBV, CMV und HHV-6, kann bei Patienten nach einer allogenen Stammzelltransplantation zu schwerwiegenden Erkrankungen und sogar zum Tod führen. Zur Behandlung von EBV- oder CMV-assoziierten Komplikationen hat sich in der Vergangenheit der adoptive Transfer von virusspezifischen T-Zellen, die aus dem T-Zellgedächtnis des Stammzellspenders isoliert wurden, als wirksam und gut verträglich erwiesen.

Patienten mit einem CMV-negativen Transplantatspender haben ein erhöhtes Risiko für CMV-assoziierte Erkrankungen, und gerade in diesem Fall fehlt eine adoptive Therapie, weil CMV-spezifische T-Zellen von einem solchen Spender nicht verfügbar sind. Um dieses Problem zu lösen, habe ich in meiner Arbeit die Herstellung von CMV-spezifischen T-Zellen mittels retroviralem Transfer des spezifischen T-Zellrezeptors untersucht. Zuerst habe ich CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellklone mit verschiedenen HLA-Restriktionen, die die endogen prozessierten und präsentierten CMV-Antigene pp65 und IE-1 erkennen, aus dem T-Zellgedächtnis von CMV-positiven Spendern generiert und charakterisiert. Für den retroviralen Transfer wurden vier pp65-spezifische T-Zellrezeptoren unterschiedlicher HLA-Restriktionen ausgewählt. Die Gene der TCRs wurden kloniert und auf primäre T-Zellen CMV-negativer Spender übertragen. CMV-TCR-transgene T-Zellen zeigten ein breites Spektrum an wichtigen Effektorfunktionen wie die Freisetzung von IFN- γ und IL-2 sowie Zytotoxizität und Proliferation gegenüber endogen prozessiertem pp65, und die Zellen konnten durch strikt antigenspezifische Stimulation angereichert und expandiert werden. Die Expansion der TCR-transgenen Zellen war von einem Anstieg der spezifischen Effektorfunktionen begleitet, was zeigt, dass die übertragene Spezifität stabil und voll funktionsfähig war. Deshalb erwarte ich, dass diese CMV-TCR-transgenen T-Zellen sich für die effektive Kontrolle einer akuten CMV-Infektion eignen und darüber hinaus für ein antivirales Gedächtnis sorgen werden.

Auch die Reaktivierung von HHV-6 führt in immunsupprimierten Patienten zu ernsthaften Erkrankungen. Leider ist es allerdings bisher nicht möglich, HHV-6-spezifische T-Zellen für den adoptiven Transfer herzustellen, weil die Antigene und Epitope der HHV-6-spezifischen Immunantwort nicht bekannt sind. Durch die Stimulation mit Peptiden aus den HHV-6-Tegumentproteinen U11 und U54, die aufgrund von konservierten HLA-Bindungsmotiven als CD8-T-Zellepitope vorhergesagt wurden, ist es mir gelungen, HHV-6-spezifische CD8⁺ T-Zellen von gesunden Virusträgern *in vitro* anzureichern. Ich konnte T-Zellklone spezifisch für mehrere HLA-A*0201-restringierte Epitope herstellen: die U11-Peptide GIL, MLW und SLM sowie die U54-Peptide ILY und LLC. Ich zeigte, dass ILY und LLC bei der intrazellulären Antigenprozessierung entstehen. ILY-spezifische T-Zellen erkannten virusinfizierte Zellen *in vitro*. Damit habe ich die ersten CD8-T-Zellepitope von HHV-6 charakterisiert und gezeigt, dass sich auch die HHV-6-spezifische T-Zellantwort, ähnlich wie die CMV-spezifische, gegen virale Tegumentproteine richtet. Durch Multimerfärbung von peripheren Blutzellen konnte ich zeigen, dass diese HHV-6-

spezifischen T-Zellen im T-Zellgedächtnis gesunder Virusträger im Vergleich zu anderen herpesvirusspezifischen T-Zellen selten sind. Diese Erkenntnisse liefern eine Grundlage für weitere Untersuchungen des HHV-6-spezifischen T-Zellrepertoires und helfen, Strategien für die Herstellung von HHV-6-spezifischen T-Zellen für die Immuntherapie zu entwickeln.

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Von uns meistens unbemerkt, befindet sich unser Körper täglich in einem Kampf zur Abwehr schädlicher Mikroorganismen. Um diesem Ansturm an Krankheitserregern Herr zu werden, hat der Mensch im Laufe der Evolution ein ausgeklügeltes System ineinandergreifender Komponenten und Mechanismen entwickelt. Das Immunsystem besteht aus einer Vielzahl von Molekülen und Zellen mit der Fähigkeit, zwischen "selbst" und "fremd" zu unterscheiden. Dadurch können mikrobielle Eindringlinge im Körper aufgespürt und beseitigt werden. Auch maligne körpereigene Zellen, die aufgrund von genetischen Veränderungen ihre ursprünglichen Eigenschaften verloren haben und somit als "fremd" wahrgenommen werden, können von der Immunabwehr registriert und bekämpft werden. Die vielfältigen Schutzmechanismen lassen sich in die angeborene und die erworbene, auch adaptive, Immunantwort unterteilen.

Die **angeborene Immunantwort** besteht aus zellulären und biochemischen Abwehrmechanismen, die teilweise bereits vor der Infektion oder kurz nach der Infektion wirksam werden. So bilden physikalische und chemische Barrieren, wie die Haut und antimikrobielle Substanzen, die an der Hautoberfläche produziert werden, einen ersten Schutz vor dem Eindringen von Mikroorganismen. Findet trotzdem eine Infektion statt, werden **Phagozyten** (Granulozyten, Makrophagen) und **Natürliche Killer-Zellen** (NK-Zellen) im Zusammenspiel mit dem **Komplementsystem** aktiv, um den Erreger möglichst schnell zu beseitigen. Lösliche Stoffe wie **Zytokine und Chemokine** koordinieren dabei das Zusammenspiel der Immunzellen. Die Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems richten sich gegen typische mikrobielle Strukturen und werden durch Rezeptoren vermittelt, die keinen oder nur geringen allelischen Polymorphismus aufweisen. Die Immunreaktion ist hierbei kurzfristig und nicht erregerspezifisch, sie stellt jedoch einen ersten, schnell aktivierbaren Schutzwall gegenüber vielen Pathogenen dar.

Eine dauerhafte Immunreaktion sichert die später einsetzende **adaptive Immunantwort**. Diese kann sich dem jeweiligen Erreger anpassen, braucht dafür allerdings Zeit, die vom unspezifischen Immunsystem überbrückt werden muss. Die adaptive Immunreaktion basiert auf der klonalen Selektion von **Lymphozyten**, die für den entsprechenden Krankheitserreger **hochspezifische Rezeptoren** besitzen, mit Hilfe derer sie in der Lage sind, infizierte Zellen im Körper zu detektieren und zu beseitigen. Die große Zahl von Rezeptoren mit verschiedener Spezifität wird auf genetischer Ebene ermöglicht. Durch komplexe, gesteuerte Zufallsprozesse in den ersten Reifestadien der Zellen werden die Rezeptoren der Lymphozyten gebildet. Im Anschluss daran werden diejenigen Lymphozyten, die körpereigene Strukturen erkennen, eliminiert. Nach dieser Selektion zirkulieren die **naiven**, nicht aktivierten Lymphozyten durch den Körper und die lymphatischen Organe, bis sie zum ersten Mal auf ihr **Antigen** treffen. Die spezifische Erkennung dieses fremden Proteins oder Proteinstücks führt zur Aktivierung der Zelle, was unter anderem

eine Vermehrung dieser antigenspezifischen Lymphozyten zur Folge hat. Durch diesen Reifungsprozess kommt es zur Abstimmung der Immunreaktion auf den jeweiligen Erreger und damit zu einer effizienten Abwehr des Erregers. Nach Zurückdrängung der Infektion bleiben einzelne antigenspezifische Zellen im Körper erhalten, die das sogenannte **immunologische Gedächtnis** bilden und in der Lage sind, bei erneuter Infektion mit dem selben Pathogen sehr schnell zu reagieren und damit eine noch effizientere Immunreaktion zu sichern.

Innerhalb des adaptiven Immunsystems unterscheidet man die humorale Immunität und die zelluläre Immunität, welche jeweils von verschiedenen Zelltypen vermittelt werden und verschiedene Arten von Krankheitserregern eliminieren. Die **humorale Immunantwort** dient vor allem der Eliminierung von **extrazellulären Mikroorganismen** und wird durch **Antikörper** vermittelt, die von den **B-Lymphozyten** produziert werden. Ein Antikörper ist ein lösliches Protein, das eine bestimmte dreidimensionale Molekülstruktur, ein sogenanntes **Epitop**, spezifisch bindet. Ein Epitop ist in der Regel ein bestimmter Abschnitt eines viralen oder mikrobiellen Proteins. Solche Proteine, die von Lymphozyten erkannt werden, nennt man **Antigene**. Die Bindung des Antikörpers markiert den extrazellulären Mikroorganismus und vermittelt so dessen Aufnahme und Abbau durch Fresszellen, wie Makrophagen. Durch die Antikörperbindung kann auch die Funktion der löslichen Toxine oder der viralen Proteine inhibiert werden, was dann zur Eindämmung der Infektion führen kann.

Die **zelluläre Immunität** wird durch **T-Lymphozyten** vermittelt und richtet sich vor allem gegen **intrazelluläre Mikroben**, wie Viren und einige Bakterien, die für die zirkulierenden Antikörper nicht zugänglich sind. Außerdem können auch **krankhaft veränderte Zellen** von T-Zellen erkannt und eliminiert werden. T-Zellen werden als **zytotoxische T-Zellen** ($CD8^+$ T-Zellen), **T-Helferzellen** ($CD4^+$ T-Zellen) und **regulatorische T-Zellen** ($CD4^+CD25^+$ T-Zellen) nach ihrer jeweiligen Funktion bei der Immunreaktion unterschieden. In den letzten Jahren wurden darüber hinaus noch andere T-Zellsubpopulationen mit noch nicht eindeutig geklärten Reaktivitätsspektren und Funktionen innerhalb der Immunantwort charakterisiert. Im Gegensatz zu B-Zellen sind die T-Lymphozyten nicht in der Lage, ihre spezifischen Antigene in löslicher Form zu erkennen. Sie benötigen die Präsentation von **Epitopen** im Komplex mit Proteinen des **major histocompatibility complex (MHC)**, beim Menschen auch **HLA (human leucocyte antigen)** genannt.

2.2 Die Präsentation von Antigenen auf HLA-Molekülen

Fast alle humanen Zellen sind mit einem effizienten Entsorgungs- und Recyclingsystem zum Abbau körperfremder sowie nicht benötigter oder defekter körpereigener Proteine ausgestattet. Im Rahmen des normalen Stoffwechsels einer Zelle werden die intrazellulären Proteine durch einen Multienzymkomplex, das **Proteasom**, zu Peptiden abgebaut. Diese in der Regel **8-10 Aminosäuren langen Peptide** werden durch den sogenannten **TAP-Transporter** (TAP: *transporter associated with antigen processing*) aus dem Zellplasma ins endoplasmatische

Retikulum (ER) befördert. Dort werden die Peptide mit neu gebildeten **HLA-Klasse-I-Proteinen** komplexiert. HLA-I-Moleküle bestehen aus einer α -Kette und dem β 2-Mikroglobulin. Die Faltung der HLA-I-Moleküle wird erst durch die Peptidbindung vervollständigt. Der **Peptid/HLA-I-Komplex** wird dann von TAP in das Lumen des ER freigegeben, über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert und dort über die Transmembrandomäne der α -Kette des HLA-I-Moleküls in der Zellmembran verankert. Die auf HLA-I-Molekülen präsentierten Epitope können nun von **CD8⁺ T-Zellen** mit passender Spezifität erkannt werden. Nach ihrer antigenspezifischen Aktivierung können diese T-Zellen infizierte und entartete Zellen abtöten, indem sie die zytotoxischen Stoffe Perforin und Granzym ausschütten und durch ihre Expression des Fas-Liganden, der an Fas auf den Zielzellen bindet, Apoptose induzieren. Die Präsentation von Peptiden auf HLA-I-Molekülen findet in nahezu allen Zellen statt, wodurch eine effiziente Erkennung von entarteten und infizierten Zellen gewährleistet wird.

Im Gegensatz zur Antigenpräsentation auf HLA-I-Molekülen beschränkt sich die Präsentation durch **HLA-II-Moleküle** auf sogenannte professionelle **antigenpräsentierende Zellen** (*antigen-presenting cells*, APC). Die wichtigsten APCs sind dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und aktivierte B-Zellen. Neben beiden Klassen von HLA-Molekülen exprimieren diese Zellen **kostimulatorische Oberflächenmoleküle**, wie B7.1 und B7.2, und liefern dadurch neben der antigenspezifischen Wechselwirkung das benötigte zweite Signal zur ersten Aktivierung von naiven T-Zellen. Die von ihnen durch Endozytose aus der Umgebung aufgenommenen Fremdanigene werden in den Lysosomen durch Proteasen in **10-17 Aminosäuren lange Peptide** abgebaut. Über den Golgi-Apparat werden die neu gebildeten HLA-II-Moleküle, Heterodimere aus einer α - und einer β -Kette, zu den antigenen Peptiden ins Endolysosom prozessiert. Dort wird die sogenannte *invariant chain*, die bis zu diesem Zeitpunkt die Peptidbindestelle des HLA-II-Moleküls blockiert, abgebaut. Durch diesen Mechanismus wird sichergestellt, dass von APCs nur **endosomale Peptide** präsentiert werden. Nach Beladung der HLA-II-Moleküle werden die **Peptid/HLA-II-Komplexe** an die Zelloberfläche transportiert und dort über die Transmembrandomänen der α - und der β -Kette in der Zellmembran verankert. Die Peptid/HLA-II-Komplexe können nun von **CD4⁺ T-Zellen** mit passender Spezifität erkannt werden. Hauptaufgabe dieser T-Zellpopulation ist die Steuerung der Immunreaktion im Zusammenspiel mit weiteren Immunzellen durch die Ausschüttung von Zytokinen. Sie beeinflussen dadurch die Differenzierung von B-Zellen mit Auswirkungen auf die Antikörperproduktion und die Aktivierung von zytotoxischen Zellen, wie NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und Makrophagen. Antivirale CD4⁺ T-Zellen können auch direkt infizierte Zellen abtöten.

Die Gene für die HLA-Moleküle sind in einem Cluster auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 angeordnet. Der HLA-Genloкус enthält je drei Gene für die schwere Kette von HLA-Klasse-I, genannt **HLA-A, -B und -C**, drei Gene für die α -Ketten von HLA-Klasse-II (**DP α , DQ α und DR α**), sowie drei bis vier Gene für die β -Ketten: eines für **DP β** , eines für **DQ β** und ein bis zwei Gene für

DPβ. Diese Gene besitzen einen außergewöhnlich starken Polymorphismus. Dies führt dazu, dass nur wenige Menschen den gleichen HLA-Typ besitzen. Die Antigene werden T-Zellen gegenüber in einem charakteristischen Kontext präsentiert, d.h. verschiedene Epitope aus dem gleichen Antigen werden auf unterschiedlichen HLA-Molekülen präsentiert. T-Zellen, die "eigene" Proteinfragmente auf "eigenen" (**autologen**) Zellen erkennen, werden durch verschiedene Sicherheitsmechanismen des Körpers deletiert. So verbleiben nur diejenigen T-Zellen, die "fremde" Proteinfragmente auf autologen Zellen oder endogene Proteinfragmente auf "fremden" (**allogenen**) Zellen erkennen, im Körper.

Die **Alloreaktivität von T-Zellen** gegenüber Peptiden, die auf "fremden" HLA-Molekülen präsentiert werden, ist eine entscheidende Komplikation in der Transplantationsmedizin, wenn Spender und Empfänger nicht in allen HLA-Allelen übereinstimmen. Die sogenannte **Graft-versus-Host-Disease (GvHD)**, bei der transplantierte (allogene) T-Zellen die körpereigenen (autologen) Zellen erkennen, kann beispielsweise zu schwerwiegenden Entzündungsreaktionen führen. Ein vermindertes Risiko für eine GvHD ist allerdings selbst dann gegeben, wenn Spender und Empfänger HLA-identisch sind, da sich die körpereigenen Proteine durch Genpolymorphismen geringfügig unterscheiden. Die transplantierten T-Zellen reagieren dadurch auf die Körperzellen des Empfängers, welche diese so genannten **minor histocompatibility antigens (mHA)** präsentieren. Auch bei der adoptiven T-Zelltherapie versucht man die Verabreichung von alloreaktiven T-Zellen zu vermeiden, um Nebenwirkungen zu minimieren.

2.3 Der T-Zellrezeptor

Zur spezifischen Erkennung von Zielzellen, die das antigene Epitop HLA-gebunden auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, tragen T-Zellen einen Antigenrezeptor. Dieser **T-Zellrezeptor** (*T-cell receptor*, TCR) von HLA-II-restringierten CD4⁺ Helfer-T-Zellen und HLA-I-restringierten CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen ist ein **Heterodimer** aus zwei membrandurchspannenden Polypeptidketten, die als **α- und β-Kette** bezeichnet werden und über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind (Abbildung 2-1). Eine seltenere T-Zellsubpopulation exprimiert stattdessen einen heterodimeren TCR aus einer γ- und einer δ-Kette, der Antigene nicht HLA-restringiert erkennt. Die Funktion dieser γδ-T-Zellen ist bisher nicht im Detail charakterisiert.

Jede TCR-Kette besteht aus einer **variablen (V) und einer konstanten (C) Domäne**, welche beide **immunoglobulinartig** sind, einem kurzen Gelenk und einer Transmembrandomäne sowie einem kurzen zytoplasmatischen Ende. Die V-Regionen der TCR α- und β-Kette enthalten kurze Abschnitte, in denen die Variabilität zwischen verschiedenen TCRs konzentriert ist. Diese Abschnitte heißen **komplementaritätsbestimmende Regionen** (*complementarity-determining regions*, CDRs). Drei CDRs in der α-Kette liegen drei CDRs in der β-Kette gegenüber und bilden zusammen den Teil des Rezeptors, der für die Erkennung des Peptid/HLA-Komplexes verantwortlich ist. Jede TCR-Kette ist durch **verschiedene Gensegmente** kodiert, die mit **V**

(variable), **D** (diversity), **J** (joining) und **C** (constant) abgekürzt werden. Der α -Genlokus besteht aus 70 bis 80 V-, 61 J- und einem C-Gensegment, der β -Genlokus aus 52 V-, 2 D-, 13 J- und 2 C-Gensegmenten. Durch Umlagerungen während der T-Zellreifung, die sogenannte **somatische Rekombination**, werden die Gensegmente variabel kombiniert, so dass schließlich jedes fertige TCR-Gen jeder der beiden Ketten (α und β) aus einer Kombination von jeweils einem Gensegment jedes Typs besteht (α -Kette: VJC; β -Kette: VDJC) (Abbildung 2-2). Durch die zufällige Auswahl verschiedener Gensegmente bei der Rekombination und die Kombination von jeweils zwei Rezeptorketten können Millionen verschiedener TCRs gebildet werden. Durch den **Einbau von zusätzlichen Nukleotiden** bzw. die **Deletion von bereits vorhandenen Nukleotiden** an den Rekombinationsstellen wird die Variabilität der TCRs noch gesteigert.

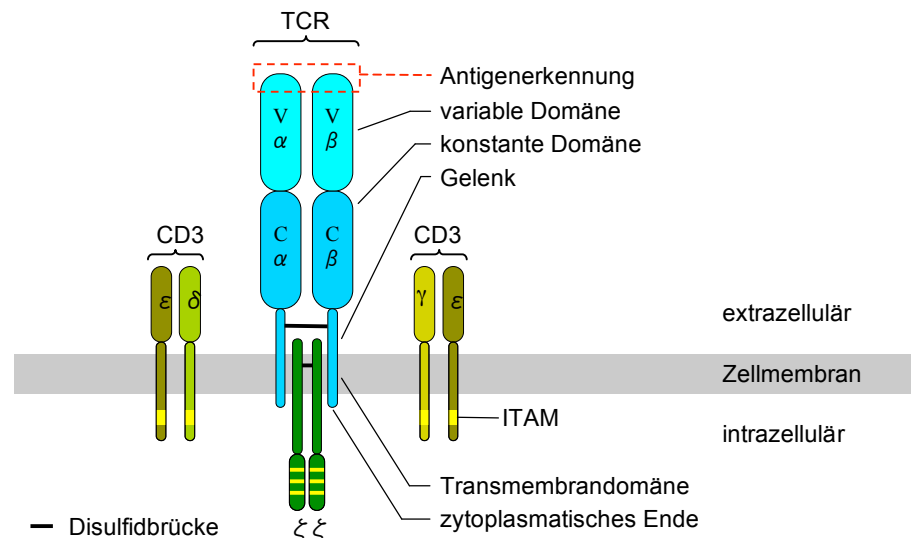


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des T-Zellrezeptorkomplexes. Jede Kette des TCR- $\alpha\beta$ -Heterodimers besteht aus einer variablen Domäne (V), einer konstanten Domäne (C), sowie aus einem Gelenk, einer Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Ende. Die Signalweiterleitung ins Zytoplasma erfolgt durch invariable akzessorische Ketten, dem CD3-Komplex, bestehend aus einem $\epsilon\gamma$ - und einem $\epsilon\delta$ -Heterodimer. Zusätzlich ist ein $\zeta\zeta$ -Homodimer assoziiert. Diese Ketten besitzen ITAM-Motive (ITAM: *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*).

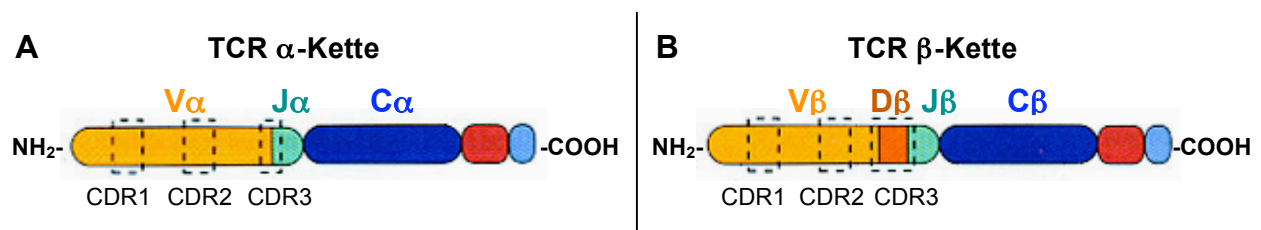


Abbildung 2-2: Domänen der TCR-Proteine. Die variablen und konstanten Regionen der TCR α - (A) und β -Kette (B) sind durch verschiedene Gensegmente kodiert: V, (D), J, C. Innerhalb der gestrichelten Boxen liegen die komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDRs).

Die **CDR3-Regionen** der α - und β -Kette umfassen die Rekombinationsstellen der V(D)J-Regionen und dadurch besonders variable Sequenzen. In diesen Regionen liegen die nicht genomisch kodierten Sequenzen des TCR. Diese TCR-Proteinabschnitte sind für die Antigenerkennung besonders wichtig (siehe auch Abbildung 2-3) und ihre Aminosäuresequenzen werden deshalb bei

der Charakterisierung von antigenspezifischen TCRs neben der Nennung der verwendeten TCR-Gensegmente angegeben. Dadurch ist die TCR-Sequenz vollständig beschrieben.

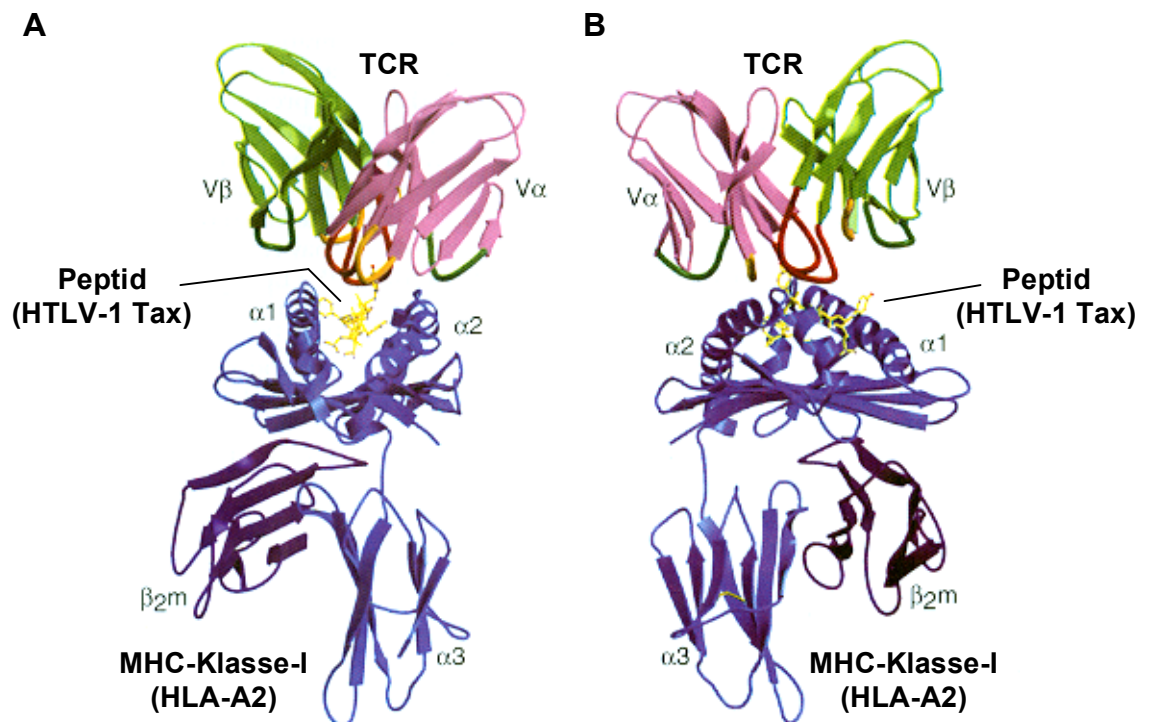


Abbildung 2-3: Proteinstruktur eines Peptid-MHC-Komplex bindenden TCRs. Die V-Domänen des HLA-A2-restringierten HTLV-1-spezifischen TCR interagieren mit dem HLA-gebundenen HTLV-1-Antigen (Tax-Peptid) (HTLV-1: humanes T-lymphotropes Virus 1). Es ist die Frontansicht (A) und Seitenansicht (B) der Röntgenkristallstruktur des trimolekularen MHC-Peptid-TCR-Komplexes dargestellt. Die CDR-Regionen sind farbig dargestellt (CDR1, gelb; CDR2, grün; CDR3, rot) (modifiziert nach Bjorkman, 1997 und Garboczi et al., 1996).

Bei der Erkennung von den auf HLA-Molekülen präsentierten Peptiden kommt es meist neben der Bindung des TCRs an den Peptid/HLA-Komplex zur zusätzlichen Bindung des **CD4- bzw. CD8-Korezeptors** an das HLA-Klasse-II- bzw. das HLA-Klasse-I-Molekül. Der TCR liegt im Komplex mit CD3-Ketten, die aus einem $\epsilon\gamma$ - und einem $\epsilon\delta$ -Heterodimer bestehen, und einem $\zeta\zeta$ -Homodimer vor. Diese Moleküle sind für die TCR-Expression an der Zelloberfläche mit verantwortlich und ermöglichen über ihre ITAM-Motive (ITAM: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) die Signaltransduktion ins Zellinnere (Abbildung 2-1). Für eine effiziente Aktivierung der T-Zellen ist die Ausbildung einer sogenannten **immunologischen Synapse** zwischen der T-Zelle und der von ihr erkannten Zelle notwendig. Diese supramolekulare Struktur wird über **Adhäsionsmoleküle** (Integrine) stabilisiert und besteht aus einer Ansammlung von mehreren TCR-Komplexen, den Korezeptoren CD4 bzw. CD8 und **kostimulatorischen Rezeptoren** (z.B. CD28) sowie ihren Liganden auf der anderen Seite (z.B. CD80 und CD86). In der immunologischen Synapse kommen sich die Signaldomänen der verschiedenen Rezeptoren ideal nahe, so dass eine effiziente Signalweiterleitung und -amplifikation erfolgen kann.

2.4 Die Familie der Herpesviren

Die Herpesviren gehören mit einem Durchmesser von 150 bis 200 nm und einem 150.000 bis 250.000 Basenpaaren umfassenden doppelsträngigem DNA-Genom, das für 100 bis über 200

Gene kodiert, zu den **größten und komplexesten Viren**. Sie werden aufgrund ihrer Pathogenese, ihres Zelltropismus und ihrer Vermehrungseigenschaften in drei Unterfamilien, **α -, β - und γ -Herpesviren**, eingeteilt (Tabelle 2-I).

Tabelle 2-I: Charakteristische Vertreter der humanen Herpesviren

Unterfamilie	Genus	Virusvertreter
α -Herpesviren	Simplexvirus	Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1) (Humanes Herpesvirus 1 [HHV-1]) Herpes-simplex-Virus 2 (HSV-2) (Humanes Herpesvirus 2 [HHV-2])
	Varicellavirus	Varicella-Zoster-Virus (VZV) (Humanes Herpesvirus 3 [HHV-3])
β -Herpesviren	Cytomegalievirus	Humanes Cytomegalievirus (HCMV oder CMV) (Humanes Herpesvirus 5 [HHV-5])
	Roseolovirus	Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6)
		Humanes Herpesvirus 7 (HHV-7)
γ -Herpesviren	Lymphocryptovirus	Epstein-Barr-Virus (EBV) (Humanes Herpesvirus 4 [HHV-4])
	Rhadinovirus	Karposi-Sarkom-Virus (KSV) (Humanes Herpesvirus 8 [HHV-8])

Durch die hohe Kodierungskapazität und der damit verbundenen großen Zahl an viralen Proteinen weisen die Herpesviren ein äußerst komplexes Verhalten bei der Infektion auf. Typisch für alle Herpesviren ist ihre Fähigkeit zur **latenten, asymptomatischen Infektion** ihrer Träger durch **latente, nicht virusproduzierende Infektion** bestimmter Zelltypen. Dabei ist die virale Genexpression stark reduziert, wodurch eine Bekämpfung durch das Immunsystem stark eingeschränkt und damit eine komplette Eliminierung der Viren bzw. viralen Genome verhindert wird. Aufgrund der hohen Durchseuchungsrate in der gesunden erwachsenen Bevölkerung, die beispielsweise bei dem Windpockenvirus (VZV), dem Lippenherpesvirus (HSV-1), dem Dreitagefieber verursachenden HHV-6 und bei EBV über 90% liegt, findet die Infektion in der Regel bereits im Kindesalter statt. Nach der meist harmlos verlaufenden Primärinfektion **persistieren die Viren lebenslang** im Körper, meist ohne Krankheitssymptome hervorzurufen. Aus der latenten Phase können die Herpesviren zur **lytischen Infektion** reaktiviert werden, bei der neue Viruspartikel von den Zellen freigesetzt werden. EBV beispielsweise bewirkt eine kontinuierliche lytische Virusreplikation in bestimmten Zellen seines Zielzellspektrums, während es in anderen Zellen weiter latent bleibt und diese als Virusreservoir nutzt. Andere Herpesviren werden sporadisch aus der Latenz reaktiviert. Dies kann sich durch das Auftreten der entsprechenden Symptome, wie den typischen Lippenbläschen beim HSV-1, bemerkbar machen oder auch symptomlos verlaufen, wie bei der Reaktivierung von CMV. Bei gesunden, immunkompetenten Virusträgern können die Herpesviren vor allem durch die zelluläre Immunantwort gut unter Kontrolle gehalten werden. Für diese Menschen ergeben sich deshalb durch die Infektion mit Herpesviren meist keine ernsthaften Erkrankungen.

2.5 EBV als Werkzeug zur Herstellung von antigenpräsentierenden Zellen

Die Infektion mit EBV im Kindesalter verläuft meist symptomfrei. Bei einer Erstinfektion im Jugendlichen- oder Erwachsenenalter kommt es in bis zu 50% der Fälle (Faulkner et al., 2000) zur **infektiösen Mononukleose**, auch "**Pfeiffersches Drüsenfieber**" genannt. Nach der Primärinfektion verbleibt das Virus meist symptomfrei (seltene chronische Krankheitsverläufe) durch seine Persistenz in den B-Zellen des peripheren Blutes im Körper. Eine von 10.000 bis 1.000.000 B-Zellen ist in diesem Fall latent mit EBV infiziert. Die lytische Replikation des Virus findet in Epithelzellen der Rachenschleimhaut statt. EBV wird deshalb lebenslang in unterschiedlichen Mengen über den Speichel ausgeschieden und übertragen. Der Übertragungsweg gab der mit der Erstinfektion verbundenen Mononukleose im Jugendlichen- oder frühem Erwachsenenalter auch die Bezeichnung "*kissing disease*".

EBV ist allerdings auch mit verschiedenen schweren **malignen Erkrankungen** assoziiert und wahrscheinlich an deren Entstehung beteiligt (Rickinson und Kieff, 2001). Zuerst wurde EBV in Zelllinien aus einem **Burkitt-Lymphom**, einem B-Zelltumor, entdeckt. Das Burkitt-Lymphom ist mit einer Inzidenz von zehn Fällen pro 100.000 Personen und Jahr die häufigste kindliche Tumorerkrankung in Afrika und in der dort endemischen Form zu 100% mit EBV assoziiert. Dieses Lymphom ist ein Musterbeispiel für die sogenannte **Latenz I** von EBV (Rowe et al., 1992) bei der nur ein einziges EBV-Protein exprimiert wird, nämlich EBNA1. Eine weitere zu 100% mit EBV assoziierte Tumorerkrankung ist das **Nasopharynxkarzinom**, ein epithelialer Tumor, der mit einer Inzidenz von etwa 20 Erkrankungen pro 100.000 Personen und Jahr der häufigste Tumor in Südostasien und China ist. Unterschiedlich stark ist die EBV-Assoziation mit verschiedenen Formen des **Morbus Hodgkin**, bei dem es sich um eine maligne Erkrankung B-lymphoider Vorläuferzellen handelt. Seltener sind verschiedene Formen von **T-Zelllymphomen**, darunter auch zu 100% mit EBV verbundene Erkrankungen. Allen diesen Tumoren ist eine EBV-Infektion in Form der **Latenz II** gemeinsam, wobei nur die viralen Proteine EBNA1, LMP1 und LMP2 exprimiert werden. Bei immunsupprimierten Patienten, etwa nach medikamentöser Immunsuppression nach einer therapeutischen Transplantation oder in der Spätphase der AIDS-Erkrankung, kommt es häufig zum Auftreten immunoblastischer B-Zelllymphome, wie beispielsweise der **EBV-assoziierten PTLD** (PTLD: *post-transplant lymphoproliferative disease*). Hier liegt EBV in der **Latenz III** vor; es werden die nukleären Antigene EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C und EBNA-LP sowie die latenten Membranproteine LMP1 und 2 exprimiert.

EBV infiziert *in vitro* sehr effizient humane B-Zellen (Pope et al., 1968), aber auch die Infektion von epithelialen Zellen (Imai et al., 1998) und Monozyten (Savard et al., 2000) ist möglich, jedoch weit weniger effizient. Die Bindung des viralen Glykoproteins gp350 an den Komplementrezeptor 2 (CR2 oder CD21) (Fingerroth et al., 1984) sowie die Wechselwirkung des heterotrimeren Komplexes aus den viralen Proteinen gH, gL und gp42 mit dem HLA-II-Molekül (Li et al., 1997)

sind hauptverantwortlich für den ausgeprägten B-Zelltropismus des EBV. Die Infektion von B-Zellen führt zur **Wachstumstransformation der Zellen** und es entstehen unabhängig von äußeren Stimuli proliferierende B-Zelllinien, sogenannte **lymphoblastoide Zelllinien** (*lymphoblastoid cell lines*, **LCLs**). Diese EBV-Transformation *in vitro* ist die einfachste Möglichkeit zur Herstellung einer permanenten Zelllinie von jedem beliebigen humanen Spender. In LCLs liegt EBV überwiegend in der **Latenz III** vor, d.h. es werden sämtliche latenten Proteine exprimiert. Ein kleiner Anteil der Zellen einer LCL befindet sich jedoch auch im lytischen Zyklus, wobei die lytischen Antigene exprimiert werden und infektiöses Virus freigesetzt wird.

Aus Untersuchungen mit Virusmutanten weiß man, dass die Anwesenheit der latenten EBV-Gene ausreicht, um eine Wachstumstransformation von B-Zellen zu gewährleisten (Kempkes et al., 1995). Der weniger als die Hälfte der DNA-Basensequenz umfassende EBV-Vektor aus Teilbereichen des EBV-Genoms, der im Wesentlichen nur diese latenten Gene enthält, wird **mini-EBV** genannt. Mit Hilfe der Verpackungszelllinie 293/TR-, die ein weiteres, seinerseits jedoch nicht verpackbares EBV-Genom enthält und so den mini-EBV-Vektor komplementiert, können *in vitro* infektiöse mini-EBV-Partikel hergestellt werden (Delecluse et al., 1999). Die mit mini-EBV-Viren infizierten B-Zellen werden **mini-LCLs (mLCLs)** genannt. Diese ebenfalls wachstumstransformierten permanenten B-Zelllinien verhalten sich ähnlich den mit Wildtyp-EBV infizierten LCLs, sie können ihrerseits allerdings kein infektiöses Virus freisetzen.

LCLs eignen sich hervorragend als antigenpräsentierende Zellen zur Anreicherung von EBV-spezifischen T-Zellen *in vitro*. Auch mLCLs können für die Stimulation von EBV-spezifischen T-Zellen verwendet werden, allerdings werden nur die T-Zellen, welche spezifisch latente EBV-Antigene erkennen, angereichert. Durch den Einbau von Expressionskassetten für Fremdanigene in den mini-EBV-Vektor wurden darüber hinaus äußerst praktische Werkzeuge zur Anreicherung von anderen antigenspezifischen T-Zellen hergestellt. So wurden beispielsweise die CMV-Antigene pp65 (Moosmann et al., 2002) und IE-1 (Wiesner, 2005) in den mini-EBV-Vektor integriert, **pp65-mLCLs** sowie **IE-1-mLCLs** hergestellt und bereits erfolgreich zur Anreicherung von CMV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verwendet (Moosmann et al., 2002; Wiesner, 2005; Wiesner et al., 2005). LCLs und mLCLs können von jedem beliebigen Spender hergestellt werden, so dass für die Stimulation von EBV- bzw. CMV-spezifischen T-Zellen jeweils die autologe B-Zelllinie verwendet werden kann. Die EBV- bzw. CMV-Antigene werden dabei endogen prozessiert und den T-Zellen auf HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Molekülen präsentiert. Durch Beladung mit den entsprechenden löslichen Peptiden können zusätzlich auch T-Zellen anderer Spezifitäten stimuliert werden. Als Kontrollen für die Analyse von virusspezifischen T-Zellen dienen jeweils die **EBV-freien permanenten B-Zelllinien** der entsprechenden Spender, die durch wöchentliche Stimulation mit CD40-Ligand tragenden Fibroblasten unter Anwesenheit von IL-4, immortalisiert werden (Wiesner et al., 2008). Diese CD40-aktivierten B-Zelllinien werden kurz **B-Blasten (BBL)** genannt.

2.6 CMV und die spezifische Immunität

CMV ist mit etwa 250.000 Basenpaaren doppelsträngiger DNA und mehr als 200 bekannten Genen der größte Vertreter der humanen Herpesviren. Es wurde erstmals 1956 von Smith aus der Speicheldrüse und den Nieren eines Kindes isoliert (Smith, 1956). Wie die anderen Herpesviren persistiert auch das Cytomegalievirus lebenslang **meist symptomlos** im Körper und die Durchseuchungsrate in der Bevölkerung ist relativ hoch. Die Primärinfektion findet dabei recht früh statt: 0,2-2% bereits *in utero*, 8-60% in den ersten sechs Lebensmonaten bzw. 40-80% vor der Pubertät. Der Anteil der infizierten Erwachsenen variiert stark je nach Land und sozialer Gruppenzugehörigkeit. In Deutschland ist etwa die Hälfte der Bevölkerung mit CMV infiziert. Die Primärinfektion mit CMV verläuft meist symptomlos. Gelegentlich werden unspezifische Fieberreaktionen oder ein Mononukleose-ähnliches Krankheitsbild beobachtet. **Pränatale Infekte** jedoch führen in etwa 10% der Fälle zu Entwicklungsdefekten und Schädigungen des zentralen Nervensystems, am häufigsten sind Gehörschäden (Fowler et al., 1992). Das Risiko einer Ansteckung des Ungeborenen liegt bei einer Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft bei 35-50% (Stagno et al., 1986). Die perinatale Übertragung des Virus auf das Neugeborene kann zu ähnlichen, aber abgeschwächten Symptomen führen. CMV stellt außerdem ein klinisch bedeutendes Problem bei **immundefizienten Personen** dar. Sowohl bei HIV-Infizierten (HIV: *human immunodeficiency virus*), die bereits an der dadurch erworbenen Immundefizienz (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) leiden, wie auch bei Patienten, die wegen einer Organ- oder Blutstammzelltransplantation mit immunsupprimierenden Medikamenten behandelt werden, kommt es zu ernsthaften Krankheitsbildern mit Schädigungen verschiedener Organe (Lunge, Magen-Darm-Trakt, Leber, Netzhaut, Zentrales Nervensystem) und bei Organtransplantationspatienten zur Entzündung und Abstoßung des Transplantats.

CMV besitzt einen relativ **breiten Zelltropismus**. So liegt es bei gesunden Virusträgern latent in Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen sowie ihren Vorläuferzellen vor (Hahn et al., 1998; Soderberg-Naucler et al., 1997). Bei CMV-assoziierten Erkrankungen infiziert das Virus weitere Zelltypen, darunter besonders epitheliale Zellen der Nieren, des Magen-Darm-Trakts, der Lunge sowie Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Hepatozyten. Die Infektion von Fibroblasten wird *in vivo* seltener beobachtet, stellt jedoch *in vitro* paradoxerweise die am besten für die lytische CMV-Infektion geeignete Zellart dar und wird deshalb als klassisches Zellkultursystem für die Kultivierung und Propagierung von CMV verwendet.

CMV induziert, wie auch die anderen Herpesviren, eine **massive humorale und zelluläre Immunantwort**. Sowohl humane wie auch Tiermodelle haben gezeigt, dass vor allem die CD8⁺ T-Zellantwort die virale Replikation limitiert und der klinischen Manifestierung einer progressiven CMV-Infektion entgegenwirkt (Einsele et al., 2002; Greenberg und Riddell, 1999; Reddehase, 2002). Die Hauptzielantigene der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellantwort sind dabei die viralen Proteine **pp65** (Wills et al., 1996), ein Tegumentprotein, und **IE-1** (Khan et al., 2002), ein viraler

Transkriptionsfaktor, wobei auch viele andere CMV-Proteine von virusspezifischen T-Zellen erkannt werden (Elkington et al., 2003; Sylwester et al., 2005). Mehrere Prozent der CD8⁺ T-Zellen von Gesunden können dabei spezifisch für nur ein CMV-Epitop sein (Gillespie et al., 2000; Kern et al., 1999). Ungewöhnlicherweise steigt die Anzahl an CMV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen mit dem Alter sogar an und überflutet das T-Zellgedächtnis, man spricht von der **memory inflation** dieser T-Zellen (Day et al., 2007; Karrer et al., 2003; Pourgheysari et al., 2007). Die Gründe und Folgen dieses Phänomens sind noch nicht vollständig geklärt. Die Immundominanz von seneszenten CMV-spezifischen T-Zellen könnte jedoch die Immunantwort gegen andere Pathogene beeinträchtigen und somit einen schädlichen Einfluss auf die Gesundheit von älteren CMV-Virusträgern haben (Akbar und Fletcher, 2005).

CMV infiziert unter anderem Blutzellen wie Monozyten oder Makrophagen, die ausgeprägte Antigenpräsentationsfähigkeiten besitzen. Dies könnte grundlegend für die starke Immunogenität des Virus und die Evolution verschiedener **immunevasiver Strategien** durch das Virus sein (Loenen et al., 2001; Mocarski, 2004). Das CMV-Genom kodiert für eine Reihe von Proteinen, die **immunmodulatorische Eigenschaften** besitzen und dem Virus helfen, dem Immunsystem zu entgehen. So interferieren mindestens vier CMV-Proteine, US2, US3, US6, und US11, mit der HLA-restringierten Antigenpräsentation, durch Inhibition der TAP-Peptidtransporter oder Dislokation und Abbau von HLA-Molekülen (Basta und Bennink, 2003). Auch die NK-zellvermittelte Immunantwort wird beeinträchtigt. Das virale Protein UL40 stabilisiert beispielsweise die Expression des nicht-klassischen MHC-Moleküls HLA-E (Tomasec et al., 2000) und das CMV-Protein UL18 wird als HLA-Analog auf der Oberfläche einer infizierten Zelle exprimiert (Beck und Barrell, 1988; Reyburn et al., 1997). Darüber hinaus kodiert CMV für mehrere Chemokinrezeptor- und Zytokin-Analoga (Loenen et al., 2001).

Den Stellenwert eines intakten antiviralen Immunsystems zur Kontrolle der CMV-Infektion zeigt besonders die Inzidenz und Schwere von CMV-Komplikationen bei immundefizienten Patienten. CMV-assoziierte Erkrankungen können durch Virostatika, wie **Ganciclovir** und **Foscarnet**, unter Kontrolle gehalten werden. Die antivirale Medikation ist allerdings von schweren Nebenwirkungen begleitet. So führt etwa Ganciclovir zur Leukopenie und Thrombopenie (Crumpacker, 1996). Foscarnet ruft Nierenschäden und Hyperkaliämie hervor (Sissons und Carmichael, 2002). So bleibt das Virus trotz routinemäßigem Einsatz dieser Medikamente ein bedeutender Risikofaktor, der die Mortalität nach Transplantation erhöht, sei es wegen nicht-therapierbarer Infektionsfolgen oder wegen der Nebenwirkungen der antiviralen Medikation (Boeckh et al., 2003; Broers et al., 2000).

2.7 Transfer CMV-spezifischer T-Zellrezeptoren zur Therapie von CMV-assoziierten Komplikationen nach allo-KMT

Die Entstehung einer CMV-assoziierten Erkrankung nach einer **allogenen Knochenmarkstransplantation (allo-KMT)** hängt stark mit der fehlenden oder verzögerten Rekonstitution der CMV-spezifischen T-Zellantwort zusammen (Boeckh et al., 2003; Ganepola et al., 2007; Hebart et al., 2002; Li et al., 1994; Reusser et al., 1991). Auch die Tatsache, dass eine CMV-spezifische zytotoxische CD8⁺ T-Zelle in 5.000 bis 20.000 zirkulierenden T-Zellen und in etwa die gleiche Häufigkeit an CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen eine CMV-Reaktivierung in gesunden Virusträgern verhindert (Borysiewicz et al., 1988), weist auf die Bedeutung der antiviralen T-Zellimmunität hin. Deshalb konzentrieren sich die aktuellen therapeutischen Konzepte auf die Rekonstitution der CMV-spezifischen zellulären Immunantwort. Der **adoptive Transfer** von CMV-spezifischen T-Zellklonen (Riddell et al., 1992) und T-Zelllinien (Cobbold et al., 2005; Einsele et al., 2002; Peggs et al., 2003) war in der Vergangenheit bereits sehr effektiv bei der Behandlung und Prävention CMV-assoziiierter Erkrankungen (Moss und Rickinson, 2005). Dabei wurden die transferierten T-Zellen immer von dem CMV-seropositiven Knochenmarksspende isoliert. Leider ist die Isolation und Anreicherung von CMV-spezifischen T-Zellen mit CMV-negativen Spendern schwierig, wenn nicht unmöglich, weil naive CMV-spezifische T-Zellen zu selten sind, um innerhalb der peripheren T-Zellen direkt detektiert oder gar isoliert zu werden (Gillespie et al., 2000). Aus dem gleichen Grund haben CMV-positive Empfänger einer Knochenmarksspende von einem CMV-negativen Spender allerdings ein besonders hohes Risiko, ernsthaft durch die CMV-Reaktivierung zu erkranken, weil die Rekonstitution der CMV-spezifischen Immunität stark eingeschränkt ist (Boeckh und Nichols, 2004; Moss und Rickinson, 2005). Eine Möglichkeit zur effizienten Herstellung CMV-spezifischer T-Zellen von CMV-negativen Transplantatspendern und damit eine Therapieoption in der genannten Spender/Empfänger-Konstellation nach allo-KMT wäre also wünschenswert.

Der **Gentransfer von spezifischen T-Zellrezeptoren** ist eine vielversprechende Möglichkeit, um T-Zellen mit Spezifitäten, die in dem T-Zellrepertoire des Spenders nicht vorhanden sind, herzustellen (Clay et al., 1999; Dembic et al., 1986; Schumacher, 2002). Kürzlich zeigten TCR-transgene T-Zellen bei der Therapie von Patienten mit malignen Melanom erste Erfolge. Es waren Tumorremissionen zu beobachten und die T-Zelltherapie wurde von den Patienten gut vertragen (Morgan et al., 2006). Bisher wurden allerdings TCR-transgene T-Zellen noch nicht zur Therapie von viralen Erkrankungen eingesetzt. In vielen Fällen ist die direkte Isolation und Anreicherung von virusspezifischen T-Zellen aus dem T-Zellgedächtnis des Spenders die einfachere und bessere Alternative. In dem oben genannten Fall, also einem CMV-negativen KMT- und T-Zellspender ohne CMV-spezifisches T-Zellgedächtnis, wäre die Herstellung von CMV-spezifischen T-Zellen mittels CMV-spezifischem TCR-Transfer die einfachste Therapieoption. Der adoptive Transfer von CMV-TCR-transgenen T-Zellen sollte außerdem ein besonders geeignetes Anwendungsbeispiel

für den klinischen Einsatz von TCRs sein, weil CMV-spezifische TCRs, die *in vivo* aufgrund ihrer antiviralen Funktion und Aufrechterhaltung selektiert wurden, im T-Zellrepertoire CMV-positiver Spender leicht zugänglich sind. Wie bereits genannt, haben gesunde Virusträger einen hohen Anteil an CMV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen (Sylwester et al., 2005; Wills et al., 1996). Viele T-Zellepitope der immundominanten CMV-Antigene pp65 und IE-1 (und andere) mit verschiedenen HLA-Restriktionen sind bereits charakterisiert (Elkington et al., 2003; Sylwester et al., 2005; Wiesner et al., 2005; Wills et al., 1996). Auch einige CMV-spezifische TCR-Kettensequenzen, von denen manche auch bei mehreren Spendern zu finden sind ("*public TCRs*"), sind bereits bekannt (Brennan et al., 2007; Day et al., 2007; Gandhi et al., 2003; Heemskerk et al., 2007; Khan et al., 2002; Price et al., 2005; Trautmann et al., 2005; Venturi et al., 2008; Weekes et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit soll deshalb die Realisierbarkeit des Gentransfers CMV-spezifischer TCRs auf T-Zellen von CMV-negativen Spendern zur Herstellung CMV-TCR-transgener T-Zellen für die Immuntherapie von CMV-assoziierten Erkrankungen nach allo-KMT gezeigt werden.

2.8 HHV-6 und die spezifische Immunität

Das Humane Herpesvirus 6 (HHV-6) wurde 1986 als humanes B-lymphotropes Virus (HBLV) von Salahuddin und Kollegen aus Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen isoliert (Salahuddin et al., 1986). Später stellte sich heraus, dass HHV-6 ein **immunotropes Virus** ist, das verschiedene Zelltypen des zellulären und humoralen Immunsystems infizieren kann. Die Hauptzielzellen sind jedoch CD4⁺ T-Zellen (Lusso et al., 1988; Takahashi et al., 1989). HHV-6 gehört zusammen mit HHV-7 zum **Genus Roseolovirus** innerhalb der β -Herpesviren. Die Roseoloviren zeichnen sich durch einen ausgeprägten T-Zelltropismus, die Fähigkeit, mit geringer Effizienz auch in anderen Zelltypen zu replizieren, eine hohe Prävalenz in der Bevölkerung und die Assoziation mit kindlichen Fiebersyndromen, die teilweise von Hautausschlag begleitet sind, aus. Die HHV-6-Virusstämme lassen sich in zwei verschiedene Virusvarianten, **HHV-6A und HHV-6B** einteilen, die sich in genetischen, immunologischen und biologischen Eigenschaften unterscheiden (Ablashi et al., 1991).

Die Primärinfektion mit HHV-6 findet recht früh in der Kindheit statt, meistens im Alter von 6-9 Monaten (Caserta et al., 2001) und ruft in 17% der Fälle die Kinderkrankheit "**Dreitagefieber**" hervor, auch **exanthema subitum**, **roseola infantum** oder **sixth disease** genannt (Yamanishi et al., 1988). Die Krankheit ist durch hohes Fieber und die Entwicklung von Hautausschlägen nach Abklingen des Fiebers gekennzeichnet. In den restlichen Fällen verläuft die HHV-6-Infektion symptomlos oder nur mit einer undifferenzierten kurzen Fieberperiode ohne Hautausschlag. Die Primärinfektion bei älteren Personen ist selten und von einer Fiebererkrankung oder einer heterophil-negativen infektiösen Mononukleose gekennzeichnet (Akashi et al., 1993; Niederman et al., 1988). Im Erwachsenenalter ist die Mehrheit der Bevölkerung (etwa 95%) weltweit HHV-6-positiv. Die Mehrzahl der dokumentierten Primärinfektionen geht auf HHV-6B zurück (Zerr, 2006).

Die Epidemiologie und klinische Relevanz von HHV-6A ist dagegen noch nicht genau untersucht. HHV-6A wird allerdings öfter in immundefizienten Patienten gefunden als in immunkompetenten und scheint stärker neurotrop zu sein als HHV-6B (Zerr, 2006). Generell gilt die Infektion mit HHV-6 bei Immunkompetenten als relativ harmlos (Caselli und Di Luca, 2007). Die Reaktivierung von HHV-6 bei **Patienten mit geschwächtem Immunsystem**, so zum Beispiel vor allem bei AIDS-Patienten und nach einer Knochenmarks- oder Organtransplantation, aber auch während der Schwangerschaft oder ernsthafter Krankheitsperioden, kann dagegen zu ernsthaften Erkrankungen und zu einer erhöhten Sterberate führen (Dahl et al., 1999; Razonable et al., 2002; Zerr, 2006). HHV-6 reaktiviert in 40-50% der Patienten, die eine hämatopoetische Stammzelltransplantation erhalten haben, und zu einem ähnlichen Anteil in Patienten nach einer Organtransplantation (Humar et al., 2002; Ljungman et al., 2000; Yoshikawa et al., 2000; Yoshikawa et al., 1992). Die Reaktivierung findet dabei meist 2-6 Wochen nach der Transplantation statt und wird in den meisten Fällen durch HHV-6B verursacht. HHV-6A verursacht nur 2-3% der Reaktivierungen (Zerr, 2006; Zerr et al., 2005). HHV-6 kann in diesem Zusammenhang schwere Erkrankungen des zentralen Nervensystems hervorrufen, wie beispielsweise Enzephalitis, die mit Verwirrung, Depressionen und Gedächtnisverlust verbunden sein kann. HHV-6 wird auch mit Multipler Sklerose in Verbindung gebracht (Cermelli et al., 2003; Challoner et al., 1995; Goodman et al., 2003). Trotz der großen Zahl an Studien, die einen Zusammenhang zwischen Erkrankung, Sterblichkeit und HHV-6-Reaktivierung klar zeigen, ist die Rolle des Virus als Krankheitsauslöser noch nicht im Detail bekannt.

Zur antiviralen Therapie von HHV-6-assoziierten Erkrankungen werden die üblichen anti-herpesviralen Medikamente, wie **Ganciclovir**, **Foscarnet** und **Cidofovir** eingesetzt, wobei die letzten beiden sich als am wirksamsten erwiesen haben. Durch schwere Nebenwirkungen, wie etwa Leberschäden, ist die Anwendung dieser Virostatika allerdings begrenzt. Eine zelluläre Therapie durch den adoptiven Transfer von virusspezifischen T-Zellen wäre höchstwahrscheinlich, wie auch bei der Reaktivierung der anderen Herpesviren EBV und CMV (Moss und Rickinson, 2005), eine sehr hilfreiche Alternative. Leider ist jedoch bisher über die zelluläre Immunantwort gegen HHV-6 noch zu wenig bekannt, um solche T-Zellen effektiv *in vitro* herzustellen.

Ähnlich wie die anderen Herpesviren hat HHV-6 **immunmodulatorische Strategien** entwickelt, um eine günstige Umgebung für sein Wachstum und seine lebenslange Persistenz im Körper zu schaffen (Lusso, 2006). Eine wichtige Strategie hierbei ist die **Infektion von Immunzellen**. HHV-6 repliziert sehr effizient in $CD4^+$ T-Zellen und führt zu einem zytopathischen Effekt, was eine direkte Ursache für eine Suppression des Immunsystems sein könnte. HHV-6A repliziert darüber hinaus auch in verschiedenen zytotoxischen Effektorzellen, wie $CD8^+$ T-Zellen, NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen (Lusso, 2006), und behindert damit die antivirale Immunabwehr. Zellen des mononukleären phagozytischen Systems sind neben den $CD4^+$ T-Zellen wichtige Orte der Latenz von HHV-6 (Kondo et al., 1991). Auch Knochenmarkszellen ($CD34^+$) können von HHV-6 infiziert werden, was zu dramatischen suppressiven Auswirkungen auf das Wachstum und die Reifung von

Vorläuferzellen führt (Knox und Carrigan, 1992). Das humane Glykoprotein CD46, welches auf allen kernhaltigen humanen Zellen exprimiert ist (Liszewski et al., 1991) und zur Familie der Regulatoren der Komplementaktivierung gehört, wurde als Hauptrezeptor sowohl für HHV-6A wie auch für HHV-6B beschrieben (Santoro et al., 1999). Es wird jedoch vermutet, dass alternative Rezeptoren und verschiedene Korezeptoren für den unterschiedlichen Zelltropismus der beiden Virusvarianten verantwortlich sein könnten (Lusso, 2006). Die **Bindung von HHV-6 an CD46** führt zu fundamentalen Veränderungen in der Physiologie von Immunzellen, z.B. zur selektiven Suppression der IL-12-Produktion durch antigenpräsentierende Zellen, zur Deregulation der Komplementaktivierung und zur Induktion einer regulatorischen T-Zellantwort. Zusätzlich verändert die HHV-6-Infektion die Expression von Oberflächenrezeptoren mit funktioneller Relevanz. So wird beispielsweise der TCR-Komplex durch die transkriptionelle **Unterdrückung der CD3-Expression** herabreguliert (Lusso et al., 1988; Sullivan und Coscoy, 2008), die **Expression von CD4** auf der Oberfläche von T-Zellen (auch CD8⁺ und $\gamma\delta$ -T-Zellen) wird erhöht oder sogar induziert (Lusso et al., 1991), und die Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls DC-SIGN in dendritischen Zellen wird transkriptionell unterdrückt (Lusso, 2006; Niiya et al., 2004). Die Infektion von primären humanen Monozyten führt darüber hinaus zur **Herabregulation von CD14, CD64 (FcγRI) und HLA-DR**, also von drei Oberflächenmolekülen, die eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen haben. HHV-6 **beeinflusst auch das Profil der Zytokin- und Chemokinproduktion**. Das Virus erhöht beispielsweise die Ausschüttung der inflammatorischen Zytokine IFN- α , TNF- α , IL-1 β , IL-8 und IL-15 (Lusso, 2006) sowie des proinflammatorischen Chemokins RANTES (Grivel et al., 2001; Grivel et al., 2003). Das virale Genom enthält zusätzlich auch zwei **Chemokin- sowie zwei Chemokinrezeptoranaloga** (French et al., 1999; Isegawa et al., 1998; Milne et al., 2000; Zou et al., 1999). Das Virus nutzt also diverse Mechanismen, um der Immunantwort des Körpers zu entgehen.

Trotz dieser stark ausgeprägten immunevasiven Strategien, schafft es das Immunsystem das Virus soweit zu kontrollieren, dass im Normalfall während der lebenslangen Persistenz keine HHV-6-assoziierte Erkrankung entsteht. Die hohe Inzidenz und die Schwere von HHV-6-Infektionen bei Patienten mit einer Schwäche oder Defizienz der zellulären Immunität, sei es nach einer Transplantation oder AIDS-Erkrankung, zeigt den Stellenwert der zellulären Immunantwort bei der Kontrolle von HHV-6. Für andere Herpesviren, wie EBV oder CMV, ist bekannt, dass eine starke CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort nach Infektion ausgebildet wird und bei immunkompetenten Personen diese zelluläre Immunität einen lebenslangen Schutz vor EBV- bzw. CMV-assoziierten Erkrankungen liefert (Moss und Rickinson, 2005). Ähnliches würde man auch für HHV-6 annehmen. Die T-Zellantwort gegen HHV-6 ist jedoch bisher kaum untersucht. Anfang der 90er Jahre konnte eine japanische Arbeitsgruppe zeigen, dass sich CD4⁺ T-Zellen innerhalb der peripheren Blutzellen von gesunden HHV-6-positiven Spendern durch Stimulation mit dem Lysat HHV-6-infizierter Zellen anreichern lassen (Yakushijin et al., 1991, 1992; Yasukawa et al., 1993). Die Arbeitsgruppe stellte oligoklonale T-Zelllinien her und konnte durch die Analyse dieser CD4⁺

T-Zellkulturen zeigen, dass es verschiedene Gruppen von HHV-6-spezifischen T-Zellen gibt. Manche erkennen nur Zelllysate aus HHV-6A- oder HHV-6B-infizierten Zellen, andere beide HHV-6-Subtypen, wieder andere HHV-6- und HHV-7-Lysate oder HHV-6- und CMV-Lysate, und es gibt auch HHV-6-spezifische T-Zellen, die gleichzeitig gegen alle humanen β -Herpesviren, also HHV-6, HHV-7 und CMV, reagieren (Yasukawa et al., 1993). Es scheint also CD4-T-Zellepitope zu geben, die den unterschiedlichen β -Herpesviren gemeinsam sind. Yakushijin und seine Kollegen konnten auch zeigen, dass die HHV-6-spezifischen CD4⁺ T-Zellklone nach dem HHV-6-Stimulus proliferieren, die Zielzellen abtöten und auch das Effektorzytokin IFN- γ ausschütten (Yakushijin et al., 1991, 1992). Die HHV-6-spezifische Reaktivität der T-Zellklone konnte durch Zugabe von anti-HLA-DR-Antikörper unterbunden werden, was auf eine HLA-restringierte Antigenerkennung hinweist (Yakushijin et al., 1992). Einzelheiten über die Häufigkeit dieser HHV-6-spezifischen T-Zellen oder die von den T-Zellen erkannten Antigene sind allerdings nicht bekannt. Erst in diesem Jahr wurde von einer kalifornischen Arbeitsgruppe veröffentlicht, dass nach Stimulation mit HHV-6A-Lysat nur Gedächtnis-T-Zellen des *effector memory*-Phänotyps (T_{EM}) proliferieren (Gupta et al., 2009). Die Infektion mit HHV-6A induziert in naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen des *central memory*-Phänotyps (T_{CM}) Apoptose, während T_{EM}-Zellen relativ resistent gegenüber HHV-6A-induzierter Apoptose sind. Die spezifisch auf HHV-6A-Stimulus wachsenden T_{EM}-Zellen wurden in dieser Studie nicht genauer untersucht. Wahrscheinlich wurden durch die Stimulationsmethode (Zelllysate) hauptsächlich CD4⁺ T-Zellen angereichert, dies wurde allerdings nicht detaillierter untersucht. So bleibt unklar, ob es sich um CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen handelte und welche Antigene bzw. Epitope von HHV-6-spezifischen T-Zellen erkannt werden.

Um einen detaillierteren Einblick in die HHV-6-spezifische T-Zellimmunität zu erhalten, sollte ich deshalb in meiner Doktorarbeit die Häufigkeit und Antigenspezifität von HHV-6-spezifischen CD8⁺ T-Zellen genauer untersuchen.

2.9 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten Möglichkeiten zur Therapie von herpesviralen Komplikationen nach einer allogenen Stammzelltransplantation entwickelt werden. Klinische Studien haben gezeigt, dass für eine lang anhaltende Immunität nach der Transplantation der adoptive Transfer von virusspezifischen Immunzellen wichtig ist (Heslop und Rooney, 1997; Moss und Rickinson, 2005). Es sollten deshalb herpesvirus-spezifische T-Zellen, die sich für den therapeutischen Transfer in den Patienten eignen, hergestellt und charakterisiert werden. Der Fokus lag dabei auf CMV- und HHV-6-assoziierten Erkrankungen.

Zum einen sollten CMV-spezifische T-Zellen von CMV-negativen Spendern zur Therapie von CMV-Infektionen bei Patienten mit einem CMV-seronegativen Transplantatspender hergestellt werden (siehe auch Abbildung 2-4). Die Strategie hierzu beinhaltete den retroviralen Transfer von CMV-spezifischen T-Zellrezeptoren auf primäre T-Zellen des CMV-negativen Spenders. Es

mussten also zuerst CMV-spezifische $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen mit verschiedenen HLA-Restriktionen hergestellt und charakterisiert werden. Dazu stand das bereits im Labor etablierte mini-EBV-System, das die Stimulation von T-Zellen mit mini-EBV-transformierten B-Zellen (mLCLs), die die CMV-Antigene pp65 oder IE-1 endogen prozessieren und auf HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Molekülen präsentieren, zur Verfügung (Moosmann et al., 2002; Wiesner et al., 2005). Die beiden Ketten des CMV-spezifischen T-Zellrezeptors der generierten T-Zellklone sollten dann in einen retroviralen Vektor eingebaut werden und die CMV-Spezifität mit den hergestellten TCR-transgenen Viren auf primäre T-Zellen eines CMV-negativen Spenders übertragen werden. Ziel dabei war es auch zu überprüfen, ob CMV-spezifische TCRs verschiedener HLA-Restriktionen zur Herstellung von CMV-spezifischen TCR-transgenen T-Zellen geeignet sind. Dazu sollte die Funktionalität dieser T-Zellen, nämlich die antigenspezifische Proliferation, die Ausschüttung der Effektorzytokine $IFN-\gamma$ und IL-2 sowie das Abtöten von CMV-antigentragenden Zellen, detailliert untersucht werden. Gleichzeitig sollte auch die Stabilität der CMV-spezifischen Reaktivität analysiert werden, um den Einsatz CMV-TCR-transgener T-Zellen für die Therapie von CMV-Erkrankungen zu rechtfertigen. Mit diesem Projekt sollte der Grundstein für eine spezifische T-Zelltherapie von Patienten mit einem CMV-negativen Transplantatspender gelegt werden.

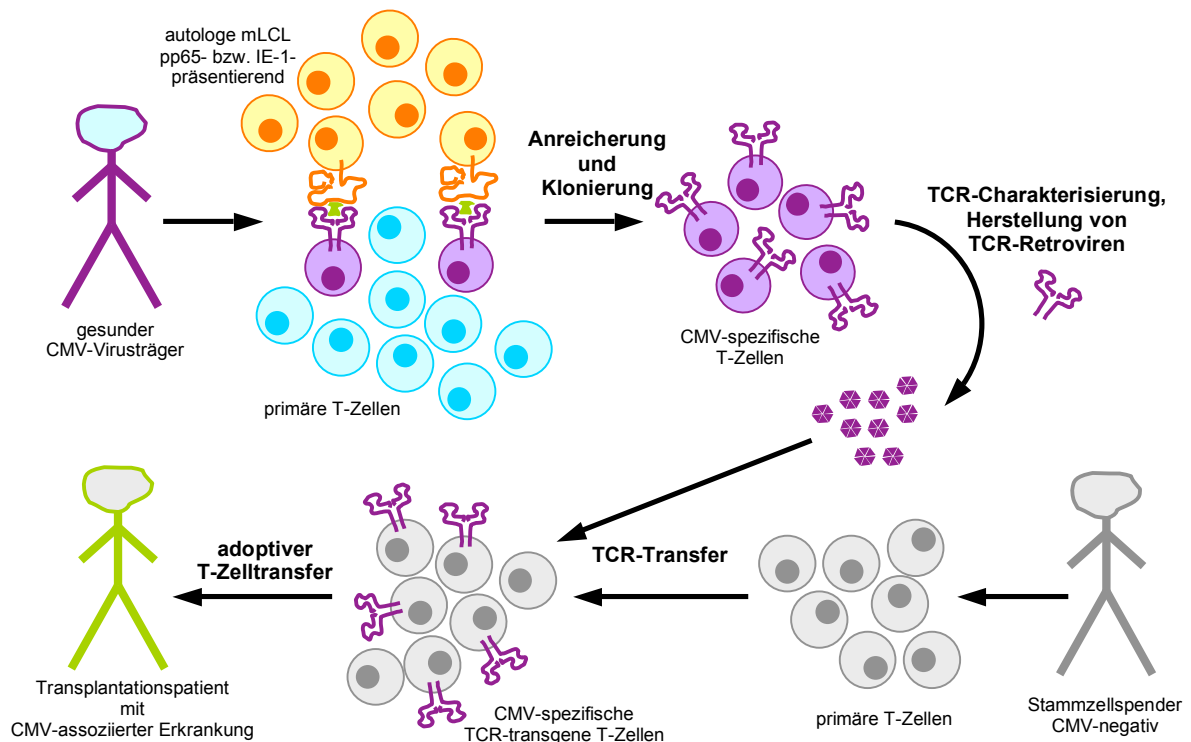


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung des adoptiven Transfers CMV-spezifischer TCR-transgener T-Zellen.

Das zweite Ziel meiner Promotionsarbeit war die Charakterisierung von Antigenen und ersten $CD8$ -T-Zellepitopen der HHV-6-spezifischen T-Zellantwort (siehe auch Abbildung 2-5). Mit Hilfe von Prädiktionsalgorithmen sollten mögliche $CD8^+$ T-Zellepitope vorhergesagt werden und die entsprechenden synthetischen HHV-6-Peptide zur Stimulation von HHV-6-spezifischen T-Zellen verwendet werden. Als antigenpräsentierende Zellen sollten autologe $CD40$ -aktivierte B-Zellen, die sich in früheren Arbeiten bereits als geeignete T-Zellstimulatorzellen erwiesen hatten (Wiesner et

al., 2008; Zentz et al., 2007), eingesetzt werden. Die Hypothese dabei war, dass durch wiederholte Stimulation von peripheren T-Zellen HHV-6-positiver Spender HHV-6-epitopspezifische T-Zellen angereichert und monoklonale T-Zelllinien generiert werden können. Die HHV-6-spezifische Reaktivität der hergestellten T-Zellklone sollte dann hinsichtlich der Erkennung von endogen prozessiertem HHV-6-Antigen sowie von HHV-6-infizierten Zellen analysiert werden. Anschließend sollte es möglich sein, die Häufigkeit der so charakterisierten HHV-6-spezifischen T-Zellen im T-Zellgedächtnis gesunder Virusträger mit Hilfe von Peptid/HLA-Multimeren zu untersuchen. Im Rahmen dieses Teilprojekts sollten damit erstmals T-Zell-Antigene und erste CD8-Epitope von HHV-6 charakterisiert und damit erste Erkenntnisse über die Realisierbarkeit einer adoptiven Therapie von HHV-6-assoziierten Erkrankungen nach einer allogenen Stammzelltransplantation durch virusspezifische T-Zellen gewonnen werden.

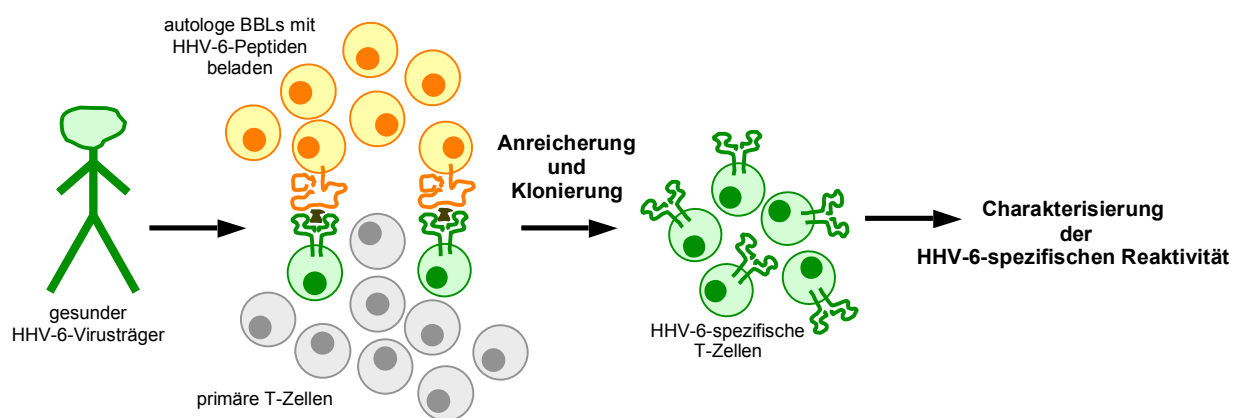


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Herstellung und Charakterisierung von HHV-6-spezifischen T-Zellklonen.

3 Material

3.1 Bakterien

E.coli-Stamm DH5 α

Genotyp:

F⁻, F80dlacZDM15, D(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1,

hsdR17(r_k⁻,m_k⁺), supE44, λ ⁻, thi-1, gyrA96, relA1

3.2 Primäre Zellen und Zelllinien

Primäre Zellen:

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) von gesunden Spendern (HLA-Typen siehe Tabelle 3-I) wurden mit dem Einverständnis der Spender gemäß der Erklärung von Helsinki des Weltärztebundes zu ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen und gemäß des Ethikvotums der lokalen Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München entnommen.

Tabelle 3-I: HLA-Typen der PBMC-Spender

Spender	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	HLA-DQ	CMV	EBV	HHV-6
F14	A*01 A*02	B*13 B*15	C*03 C*07	n.u.	n.u.	positiv	n.u.	n.u.
F31	A*01 A*02	B*07 B*08	C*07	DRB1*0301 DRB1*0401 DRB3 DRB4	DQB1*0201 DQB1*0302	n.u.	n.u.	n.u.
F36	A*02 A*68	B*07 B*35	C*04 C*07	n.u.	n.u.	positiv	n.u.	n.u.
F37	A*02 A*03	B*07 B*1505	C*04 C*07	n.u.	n.u.	positiv	n.u.	n.u.
F45	A*01 A*68	B*08 B*14	C*07 C*08	DRB1*13 DRB1*15 DRB3 DRB5	DQB1*03 DQB1*06	positiv	n.u.	n.u.
F46	A*03 A*11	B*07 B*3501	C*04 C*07	DRB1*13 DRB1*15 DRB3 DRB5	DQB1*06	positiv	n.u.	n.u.
F60	A*02 A*26	B*07 B*38	C*07 C*1203	DRB1*08 DRB1*13 DRB3	DQB1*03 DQB1*06	positiv	n.u.	n.u.
F61	A*02 A*34	B*14 B*44	C*04 C*08	DRB1*01 DRB1*07 DRB4	DQB1*02 DQB1*05	positiv	n.u.	n.u.
AC	A*0101 A*2501	B*1801 B*3701	C*06 C*12	n.u.	n.u.	positiv	positiv	positiv
AH	A*0201 A*68	B*1501 B*4001	C*03 C*04	DRB1*04 DRB1*15	DQB1*03 DQB1*06	negativ	positiv	n.u.
AM	A*0101 A*2601	B*3501 B*5701	C*0401 C*0602	DRB1*07 DRB1*11	DQB1*02 DQB1*03	negativ	negativ	positiv
AS	A*0201 A*2501	B*1503 B*51	C*1203 C*1402	DRB1*07 DRB1*08	DQB1*02 DQB1*04	negativ	positiv	n.u.
BF	A*02 A*03	B*35 B*4001	C*03 C*15	n.u.	n.u.	positiv	positiv	n.u.
BRA	A*1101 A*3101	B*3901 B*5101	C*1203 C*1502	DRB1*0404 DRB1*1301 DRB3*0101 DRB4*0103	DQA1*0103 DQA1*0301 DQB1*0302 DQB1*0603	n.u.	positiv	n.u.
BS	A*24	B*40 B*57	C*05 C*06	n.u.	n.u.	negativ	positiv	n.u.
GOE	A*24 A*25	B*38 B*44	C*05 C*12	DRB1*4 DRB1*12 DRB3 DRB4	DQB1*03	n.u.	positiv	n.u.
HAI	A*0101 A*6801	B*3701 B*5101	C*0401 C*0602	DRB1*0101 DRB1*1301 DRB3	DQA1*0101 DQA1*0103 DQB1*0501 DQB1*0603	n.u.	positiv	n.u.
JG	A*0201 -	B*3503 B*5701	C*04 C*06	DRB1*07 DRB1*11	DQB1*03 DQB1*03	positiv	positiv	positiv
JJ	A*0201 -	B*0702 B*3503	C*04 C*07	DRB1*03, DRB1*14	n.u.	positiv	positiv	positiv

JM	A*0201 A*0301	B*1529 B*5101	C*1203 C*1402	DRB1*0801 DRB1*1301 DRB3*01011	DQA1*0103 DQA1*0401 DQB1*0402 DQB1*0603	negativ	positiv	n.u.
JN	A*01 A*0201	B*07 B*4001	C*03 C*07	n.u.	n.u.	negativ	positiv	n.u.
JT	A*02 -	B*07 B*1501	n.u.	n.u.	n.u.	negativ	positiv	positiv
JU	A*0201 A*24	B*07 B*40	C*03 C*07	DRB1*07 DRB1*13	DQB1*02 DQB1*06	positiv	positiv	n.u.
LEN	A*2402 A*6801	B*3503 B*4001	C*0304 C*0401	DRB1*0101 DRB1*0701 DRB3*0101	DQA1*0101 DQA1*0201 DQB1*0303 DQB1*0501	n.u.	positiv	n.u.
LT	A*0201 -	B*0702 B*4002	C*0202 C*0702	DRB1*0401 DRB1*1501	DQB1*0301 DQB1*0602	positiv	positiv	positiv
MB	A*03 A*24	B*3501 B*4002	C*02 C*04	DRB1*01 DRB1*11	n.u.	negativ	positiv	positiv
MD	A*01 A*11	B*08 B*1501	C*03 C*07	DRB1*03 DRB1*11	DQB1*02 DQB1*03	positiv	positiv	positiv
RR	A*01 A*0201	B*1501 B*37	C*03 C*06	DRB1*13 DRB1*16	DQB1*05 DQB1*06	negativ	positiv	positiv
RZ	A*02 A*29	B*44 -	C*05 -	DRB1*04 DRB1*15	DQB1*03 DQB1*06	positiv	positiv	n.u.
SI	A*0201 -	B*44 B*51	C*02 C*05	DRB1*08 DRB1*11	DQB1*03 DQB1*04	negativ	positiv	positiv
SJ	A*24 -	B*1501 B*35	C*03 C*04	DRB1*03 DRB1*11	n.u.	negativ	positiv	positiv
SM	A*03 A*33	B*07 B*14	C*07 C*08	DRB1*01 DRB1*15	n.u.	negativ	positiv	positiv
TK	A*0201 A*3301	B*0702 B*1402	C*0702 C*0802	DRB1*0301 DRB1*1301 DRB3*0101 DRB3*0202	DQA1*0103 DQA1*0501 DQB1*0201 DQB1*0603	negativ	positiv	n.u.

n.u. = nicht untersucht

Zelllinien:

Die in dieser Arbeit als Stimulatorzellen zur Herstellung und Analyse von T-Zellen verwendeten B-Zelllinien – CD40-aktivierte B-Zellen (BBL), mit mini-EBV-infizierte B-Zellen (LCL bzw. mLCL) – verschiedener Spender wurden nach der in Tabelle 3-II erklärten Systematik bezeichnet.

Tabelle 3-II: Systematische Abkürzung für hergestellte B-Zelllinien

Abkürzung	Bedeutung
XYL1	CD40-aktivierte B-Zellen (EBV-frei) des Spenders XY, Linie-Nr. 1
XYB1	lymphoblastoide Zelllinie (LCL) Nr. 1 des Spenders XY; hergestellt durch Infektion von primären B-Zellen mit EBV-Stamm B95.8
XYW1	mini-lymphoblastoide Zelllinie (mLCL) Nr. 1 des Spenders XY; hergestellt durch Infektion von primären B-Zellen mit mini-EBV (1495.4)
XYP1	mini-lymphoblastoide Zelllinie (mLCL) Nr. 1 des Spenders XY, die das CMV-Antigen pp65 endogen exprimiert; hergestellt durch Infektion von primären B-Zellen mit pp65-tragendem mini-EBV (4014)
XYM1	mini-lymphoblastoide Zelllinie (mLCL) Nr. 1 des Spenders XY, die das CMV-Antigen IE-1 endogen exprimiert; hergestellt durch Infektion von primären B-Zellen mit IE-1-tragendem mini-EBV (3457)
XYV1	mini-lymphoblastoide Zelllinie (mLCL) Nr. 1 des Spenders XY; hergestellt durch Infektion von primären B-Zellen mit mini-EBV (1478.A)

B95.8	lymphoblastoide Zelllinie vom Lisztaffen (<i>saguinus oedipus</i>), latent/lytisch EBV-infiziert (Miller und Lipman, 1973; Miller et al., 1972)
L / CD40L	murine L-Zellen (Bindegewebsfibroblasten), stabil CD40-Ligand exprimierend (Garrone et al., 1995)
K562	humane chronische-myeloide Leukämie (CML)-Zelllinie; HLA-I-defizient (Lozzio und Lozzio, 1975)
293T	embryonale Nierenzellen, HLA-A2 ⁺
Jurkat 76 (J76)	TCR α - und β - defiziente CD4 ⁺ T-Zelllinie (Heemskerk et al., 2003)

Jurkat76&CD8 (J76CD8)	TCR α - und β - defiziente CD4 ⁺ T-Zelllinie, transduziert mit CD8 α ; (Wolfgang Uckert, MDC Berlin)
MOLT-3	humane T-Zellleukämie (akute lymphatische Leukämie (ALL)) (Minowada et al., 1972)

3.3 Viren

EBV B95.8	EBV-Laborstamm (Miller und Lipman, 1973; Miller et al., 1972)
HHV-6A U1102	Wildtyp-HHV-6A Stamm U1102 (Batch: NCPV #357, Health Protection Agency, Nat. Collection of Pathogenic Viruses, Salisbury, UK)
HHV-6B Z29	Wildtyp-HHV-6B Stamm Z29 (Cat.No VR-1467, Lot No. 3433676, American Type Culture Collection (ATCC))
HHV-6B HST	Wildtyp-HHV-6B Stamm HST (Batch: NCPV #355, Health Protection Agency, Nat. Collection of Pathogenic Viruses, Salisbury, UK)
mini-EBV pp65	rekombinantes, modifiziertes EBV mit pp65-Expressionskassette (Plasmid-Nr. 4014) (Moosmann et al., 2002)
mini-EBV IE-1	rekombinantes, modifiziertes EBV mit IE-1-Expressionskassette (Plasmid-Nr. 3457) (Wiesner, 2005)
mini-EBV	rekombinantes, modifiziertes EBV (Plasmid-Nr. 1478.A (Kempkes et al., 1995) Plasmid-Nr. 1495.4 (Moosmann et al., 2002))
MP71	Retrovirus, hergestellt durch Verpackung der rekombinanten, modifizierten MPSV (Myeloproliferatives Sarkomvirus)-DNA mittels Koexpression von MuLV(murines Leukämievirus)-10A1-env und Mo-MuLV-gag/pol in 293T-Zellen

3.4 Plasmide

pALF10A1 ("env")	Vektor zur eukaryotischen Expression des Haupthüllproteins (" <i>envelope</i> ") des MuLV (murines Leukämievirus)-Isolats 10A1, zur Verpackung der retroviralen MP71-DNA für die Herstellung von amphotropen Retroviren (erhalten von Wolfgang Uckert, Berlin) (Uckert et al., 2000)
pcDNA3.1-MLVg/p ("gag/pol")	Vektor zur eukaryotischen Expression der gruppenspezifischen Antigene und Polymerasen des Mo-MLV-Retrovirus, Ko-Verpackung mit MP71-DNA bei der Herstellung von MP71-Retroviren, zur Expression der MP71-DNA in den infizierten Zellen (hergestellt von Christopher Baum, Hannover; erhalten von Wolfgang Uckert, Berlin)
MP71Gpre	Retroviraler Vektor mit GFP-Markergen unter MPSV-LTR-Kontrolle, ergänzt durch mSS (<i>modified mRNA splice site</i>) und PRE-Element (posttranskriptionelles regulatorisches Element) des Murmeltier-Hepatitisvirus
MP71-NLV1 α	MP71Gpre mit der α -Kette des NLV-spezifischen TCR NLV1, ohne GFP
MP71-NLV1 β	MP71Gpre mit der β -Kette des NLV-spezifischen TCR NLV1, ohne GFP
MP71-NLV2 α	MP71Gpre mit der α -Kette des NLV-spezifischen TCR NLV2, ohne GFP
MP71-NLV2 β	MP71Gpre mit der β -Kette des NLV-spezifischen TCR NLV2, ohne GFP
MP71-NLV3 α	MP71Gpre mit der α -Kette des NLV-spezifischen TCR NLV3, ohne GFP
MP71-NLV3 β	MP71Gpre mit der β -Kette des NLV-spezifischen TCR NLV3, ohne GFP
MP71-VLE α	MP71Gpre mit der α -Kette des VLE-spezifischen TCR VLE1, ohne GFP
MP71-VLE β	MP71Gpre mit der β -Kette des VLE-spezifischen TCR VLE1, ohne GFP
MP71-YSE α	MP71Gpre mit der α -Kette des YSE-spezifischen TCR YSE, ohne GFP
MP71-YSE β	MP71Gpre mit der β -Kette des YSE-spezifischen TCR YSE, ohne GFP

MP71-IPS α	MP71Gpre mit der α -Kette des IPS-spezifischen TCR IPS, ohne GFP
MP71-IPS β	MP71Gpre mit der β -Kette des IPS-spezifischen TCR IPS, ohne GFP
MP71-QIK α	MP71Gpre mit der α -Kette des QIK-spezifischen TCR QIK, ohne GFP
MP71-QIK β	MP71Gpre mit der β -Kette des QIK-spezifischen TCR QIK, ohne GFP
MP71-RPHE α	MP71Gpre mit der α -Kette des RPHE-spezifischen TCR RPHE, ohne GFP
MP71-RPHE β	MP71Gpre mit der β -Kette des RPHE-spezifischen TCR RPHE, ohne GFP
MP71-KVYL α	MP71Gpre mit der α -Kette des KVYL-spezifischen TCR KVYL, ohne GFP
MP71-KVYL β	MP71Gpre mit der β -Kette des KVYL-spezifischen TCR KVYL, ohne GFP
pCMV2-FLAG	Plasmid zur eukaryotischen Expression von Proteinen mit N-terminalem Flag-Epitop unter der Kontrolle des CMV-Promotors (aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren (W. Hammerschmidt), Helmholtz Zentrum München)
pCMV-U11-FLAG (Hind III)	pCMV2-FLAG mit dem HHV-6B-HST-Gen U11 (in den Vektor über <i>Hind</i> III und <i>Bam</i> H I-Schnittstellen eingefügt)
pCMV-U11-FLAG (Not I)	pCMV2-FLAG mit dem HHV-6B-HST-Gen U11 (in den Vektor über <i>Not</i> I und <i>Bam</i> H I-Schnittstellen eingefügt)
pCMV-U11-435aa-FLAG	pCMV2-FLAG mit den ersten 1305 bp des HHV-6B-HST-Gens U11 zur Expression des 435 Aminosäuren langen, N-terminalen Fragments des U11-Proteins
pCMV-U11-214aa-FLAG	pCMV2-FLAG mit den ersten 642 bp des HHV-6B-HST-Gens U11 zur Expression des 214 Aminosäuren langen, N-terminalen Fragments des U11-Proteins
pCMV-U54-FLAG (Hind III)	pCMV2-FLAG mit dem HHV-6B-HST-Gen U54 (in den Vektor über <i>Hind</i> III und <i>Bam</i> H I-Schnittstellen eingefügt)
pCMV-U54-FLAG (Not I)	pCMV2-FLAG mit dem HHV-6B-HST-Gen U54 (in den Vektor über <i>Not</i> I und <i>Bam</i> H I-Schnittstellen eingefügt)

3.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden durch die Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Alle Primer sind in 5' \rightarrow 3'-Richtung angegeben.

3.5.1 Primer zur Analyse von B-Zelllinien auf Anwesenheit von EBV-Sequenzen

Primer zum Nachweis des Choramphenicol-Acetyltransferase-Gens (Überprüfung der Zelllinien auf Anwesenheit von mini-EBV-spezifischen Sequenzen)

cam-up TTC TGC CGA CAT GGA AGC CAT C
cam-down GGA GTG AAT ACC ACG ACG ATT TCC

Primer zum Nachweis des BXLFI-Gens (kodiert für das EBV-Protein gp85) (Überprüfung der Zelllinien auf Anwesenheit von Wildtyp-EBV bzw. EBV-Stamm B95.8)

gp85c TGG TCA GCA GCA GAT AGT GAA CG
gp85d TGT GGA TGG GTT TCT TGG GC

Primer zum Nachweis des β -Globin-Gens (Überprüfung der Amplifizierbarkeit von humaner genomischer DNA aus Zelllysat)

GH20	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC
PC04	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC

3.5.2 Primer zur Charakterisierung des TCR-Repertoires

Die Nomenklatur bezieht sich auf B. Arden (Arden et al., 1995)

TCR α -Repertoire (Steinle et al., 1995)

P-5' α ST	CTG TGC TAG ACA TGA GGT CT	
P-3' α ST	CTT GCC TCT GCC GTG AAT GT	
3'T-C α	GGT GAA TAG GCA GAC AGA CTT GTC ACT GGA	
PANV α 1	AGA GCC CAG TCT GTG ASC CAG	S = C/G
PANV α 1.1	AGA GCC CAG TCR GTG ACC CAG	R = A/G
V α 2	GTT TGG AGC CAA CRG AAG GAG	
V α 3	GGT GAA CAG TCA ACA GGG AGA	
V α 4	TGA TGC TAA GAC CAC MCA GC	M = A/C
V α 5	GGC CCT GAA CAT TCA GGA	
V α 6	GGT CAC AGC TTC ACT GTG GCT A	
V α 7	ATG TTT CCA TGA AGA TGG GAG	
V α 8	TGT GGC TGC AGG TGG ACT	
V α 9	ATC TCA GTG CTT GTG ATA ATA	
V α 10	ACC CAG CTG CTG GAG CAG AGC CCT	
V α 11	AGA AAG CAA GGA CCA AGT GTT	
V α 12	CAG AAG GTA ACT CAA GCG CAG ACT	
V α 13	GAG CCA ATT CCA CGC TGC G	
V α 14.1	CAG TCC CAG CCA GAG ATG TC	
V α 14	CAG TCT CAA CCA GAG ATG TC	
V α 15	GAT GTG GAG CAG AGT CTT TTC	
V α 16	TCA GCG GAA GAT CAG GTC AAC	
V α 17	GCT TAT GAG AAC ACT GCG T	
V α 18	GCA GCT TCC CTT CCA GCA AT	
V α 19	AGA ACC TGA CTG CCC AGG AA	
V α 20	CAT CTC CAT GGA CTC ATA TGA	
V α 21	GTG ACT ATA CTA ACA GCA TGT	
V α 22	TAC ACA GCC ACA GGA TAC CCT TCC	
V α 23	TGA CAC AGA TTC CTG CAG CTC	
V α 24	GAA CTG CAC TCT TCA ATG C	
V α 25	ATC AGA GTC CTC AAT CTA TGT TTA	
V α 26	AGA GGG AAA GAA TCT CAC CAT AA	
V α 27	ACC CTC TGT TCC TGA GCA TG	
V α 28	CAA AGC CCT CTA TCT CTG GTT	
V α 29	AGG GGA AGA TGC TGT CAC CA	
V α 30	GAG GGA GAG AGT AGC AGT	
V α 31NEU	TCG GAG GGA GCA TCT GTG ACT A	
V α 32	CAA ATT CCT CAG TAC CAG CA	

TCR β -Repertoire (Steinle et al., 1995)

P-5 β ST	AAG CAG AGA TCT CCC ACA C
P-3 β ST	GAG GTA AAG CCA CAG TCT GCT
P-3C β II	GAT GGC TCA AAC ACA GCG ACC TC
V β 1	GCA CAA CAG TTC CCT GAC TTG GCA C
V β 2	TCA TCA ACC ATG CAA GCC TGA CCT
V β 3	GTC TCT ACA TAT GAG AGT GGA TTT GTC ATT
V β 5.1	ATA CTT CAG TGA GAC ACA GAG AAA C
V β 5.2	TTC CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG
V β 6.1	GCC CAG AGT TTC TGA CTT ACT TC
V β 6.2	ACT CTG ASG ATC CAG CGC ACA
V β 6.3	ACT CTG AAG ATC CAG CGC ACA
V β 7	CCT GAA TGC CCC AAC AGC TCT C
V β 8	ATT TAC TTT AAC AAC AAC GTT CCG
V β 8S3	GCT TAC TTC CGC AAC CGG GCT CCT
V β 9	CCT AAA TCT CCA GAC AAA GCT
V β 10	CTC CAA AAA CTC ATC CTG TAC CTT
V β 11	TCA ACA GTC TCC AGA ATA AGG ACG
V β 12	AAA GGA GAA GTC TCA GAT
V β 12S3	GCA GCT GCT GAT ATT ACA GAT
V β 13	TCG ACA AGA CCC AGG CAT GG
V β 13.1	GAA GGA GAA GTC CCC AAT
V β 13.2	GGT GAG GGT ACA ACT GCC
V β 13S5	ATA CTG CAG GTA CCA CTG GCA
V β 14	GTC TCT CGA AAA GAG AAG AGG AAT
V β 15	AGT GTC TCT CGA CAG GCA CAG GCT
V β 16	AAA GAG TCT AAA CAG GAT GAG TCC
V β 17	CAG ATA GTA AAT GAC TTT CAG
V β 18	GAT GAG TCA GGA ATG CCA AAG GAA
V β 19	CAA TGC CCC AAG AAC GCA CCC TGC
V β 20	AGC TCT GAG GTG CCC CAG AAT CTC
V β 21	AAA GGA GTA GAC TCC ACT CTC
V β 22.1	CAT CTC TAA TCA CTT ATA CT
V β 22.2	AAG TGA TCT TGC GCT GTG TCC CCA
V β 22.3	CTC AGA GAA GTC TGA AAT ATT CG
V β 23	GCA GGG TCC AGG TCA GGA CCC CCA
V β 24	ATC CAG GAG GCC GAA CAC TTC T
V β 25	TGA AAA TGT CTT TGA TGA AAC AG
V β 26	CCT AAC GGA ACG TCT TCC AC
V β 27	ATA CTG GAA TTA CCC AGA CAC
V β 28	TAC ACA ATT CCC AAG ACA CAG

TCR β -Repertoire – degenerierte Primer (Zhou et al., 2006)

VP1	GCI ITK TIY TGG TAY MGA CA	K = G/T, Y = C/T
VP2	CTI TKT WTT GGT AYC IKC AG	M = A/C, W = A/T
CP1	GCA CCT CCT TCC CAT TCA C	I = Inosin

3.5.3 Primer zur Klonierung der TCR α - und TCR β -Gene in den retroviralen Vektor MP71Gpre

TCR Ca Eco rev	TGG AAT TCT CAG CTG GAC CAC AGC C
TCR Cb1 Eco rev	TGG AAT TCT CAG AAA TCC TTT CTC TTG ACC
TCR Cb2 Eco rev	TGG AAT TCC TAG CCT CTG GAA TCC TTT CTC

TCR Va3 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG GCC TCT GCA CCC ATC
TCR Va5 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG AAG ACA TTT GCT GGA TTT TC
TCR Va12-1 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG ATG ATA TCC TTG AGA GTT TTA CTG
TCR Va17 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG GAA ACT CTC CTG GGA GTG
TCR Va19 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG CTG ACT GCC AGC CT
TCR Va35 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG CTC CTT GAA CAT TTA TTA ATA ATC
TCR Va36 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG ATG AAG TGT CCA CAG GC
TCR Vb2 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG GAT ACC TGG CTG TAT GC
TCR Vb5-1 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG GGC TCC AGG CTG
TCR Vb5-6 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG GGC CCC GGG CTC
TCR Vb6-5 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG AGC ATC GGC CTC C
TCR Vb9 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG GGC TTC AGG CTC C
TCR Vb11-2 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG GGC ACC AGG CTC C
TCR Vb12-3 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG GAC TCC TGG ACC TTC TG
TCR Vb27-1 Not for	CGT GCG GCC GCC ACC ATG GGC CCC CAG C

3.5.4 Primer zur Klonierung der HHV-6B-Gene U11 und U54 in den Vektor pCMV2-FLAG

U11-Hind III-for:	CAG AAG CTT GCC ACC ATG GAT TTG AAA GCG CAG TCG ATC
U11-neu Not I-for	TGT GCG GCC GCC ACC ATG GAT TTG AAA GCG CAG TC
U11-BamH I-rev:	TAG GAT CCT CAC GAC GCG ATC ACT GAC TTG TC
U11-214aa-BamH I-rev_neu	TAG GAT CCT CAT TCT AGC TTT GAC CAG GAC TGG
U11-435aa-BamH I-rev	TAG GAT CCT CAT AGT AAA TCC ACG TCT CCC GTA
U54-Hind III-for:	CAG AAG CTT GCC ACC ATG CAA CCC GCC ACT CTA CAA TG
U54-Not I-for	TGT GCG GCC GCC ACC ATG CAA CCC GCC ACT CTA CAA TG
U54-BamH I-rev:	TAG GAT CCT TAC GGG GAA GAT CTA TGG GAG TAA TTA TTG

3.6 Peptide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von der Firma JPT (Berlin) in einer Reinheit von > 70% hergestellt.

Virus	Antigen	Aminosäure-position	Peptidsequenz	Abkürzung	HLA-Restriktion
HHV-6B	U11	188	YLVTSINKL	YLV	
HHV-6B	U11	381	SLMSGVEPL	SLM	
HHV-6B	U11	198	YLGKLFVTL	YLG	
HHV-6B	U11	413	GILDFGVKL	GIL	
HHV-6B	U11	750	DLSRDLDVS	DLS	
HHV-6B	U11	171	MLWYTVYNI	MLW	
HHV-6B	U11	450	DVVNGLANL	DVV	
HHV-6B	U11	60	LYNTFILWL	LYN	
HHV-6B	U11	266	DYEIIKSSL	DYE	
HHV-6B	U11	537	FRKQKKLDL	FRK	
HHV-6B	U11	13	LDRDKVQRL	LDR	
HHV-6B	U11	318	RPSADLARL	RPS	
HHV-6B	U11	181	DPWENGYL	DPW	
HHV-6B	U11	330	QPKSLDAPL	QPK	
HHV-6B	U54	195	LLCGNLLIL	LLC	
HHV-6B	U54	129	ILYGPLTRI	ILY	
HHV-6B	U54	392	SMGIFLKSL	SMG	
HHV-6B	U54	210	DYLLDDTFF	DYL	

HHV-6B	U54	106	LPVQRIEAY	LPV	
HHV-6B	U54	132	GPLTRIKIY	GPL	
HHV-6B	U54	427	MPPETPQSL	MPP	
HHV-6B	U54	373	QPVSRAPSL	QPV	
HHV-6A	U54		VIYGPLTRI	VIY	
HHV-6B	U89	149	LVLEQLGYL	LVL	
HHV-6B	U89	637	KLDKEMEAV	KLD	
HHV-6B	U89	1063	GYPSEDYDPF	GYP	
HHV-6B	U89	748	TAKRKNVPI	TAK	
HHV-6B	U89	761	SKKIKLDR	SKK	
HHV-6B	U89	758	PSKSKIKL	PSK	
HHV-6B	U89	661	ISEMITFGY	ISE	
HHV-6B	U89	360	KPRRHQFKI	KPR	
CMV	pp65	495	NLVPMTATV	NLV	HLA-A*0201
CMV	pp65	123	IPSINVHHY	IPS	HLA-B*3501
CMV	pp65	363	YSEHPTFTSQY	YSE	HLA-A*0101
CMV	pp65	265	RPHERNGFTV	RPH	HLA-B*0702
CMV	pp65	267	HERNGFTVLC	HER	HLA-B60
CMV	pp65	501	ATVQGQNLK	ATV	HLA-A*1101
CMV	pp65		KVYLESFCEDVPSGK	KVYL	HLA-DR11 (?)
CMV	pp65	188	FPTKDAL	FPT	HLA-B*3502
CMV	pp65	173	NQWKEPDVY	NQW	HLA-B*3501
CMV	IE-1	316	VLEETSVML	VLE	HLA-A*0201
CMV	IE-1	88	QIKVRVDMV	QIK	HLA-B*0801
EBV	LMP2	426	CLGGLTMTV	CLG	HLA-A*0201
EBV	BMLF1	259	GLCTLVAML	GLC	HLA-A*0201
EBV	BRLF1		YVLDHLIVV	YVL	HLA-A*0201
EBV	BZLF1		EPLPQGQLTAY	EPL	HLA-B*3501
EBV	EBNA3A	458	YPLHEQHGM	YPL	HLA-B*3501
EBV	BNRF1	1238	TDARWFAMNYPNPT	TDAR	HLA-DR15
EBV	BALF4	576	NEIFLTKKMTAVC	NEIF	HLA-DR8
EBV	BHRF1	122	PYYVVDLSVRGM	PYYV	HLA-DR4

pp65-Peptidbibliothek

1	MESR	GRRC	PEMI	SVL	36	HLPV	ADAV	IHAS	GKQ	71	IIKP	GKIS	HIML	DVA	106	TGGG	AMAG	ASTS	AGR
2	GRRC	PEMI	SVLG	PIS	37	ADAV	IHAS	GKQM	WQA	72	GKIS	HIML	DVAF	TS	107	AMAG	ASTS	AGR	RKS
3	PEMI	SVLG	PISG	HVL	38	IHAS	GKQM	WQAR	LTV	73	HIML	DVAF	TSHE	HFG	108	ASTS	AGR	RKSA	SSA
4	SVLG	PISG	HVLK	AVF	39	GKQM	WQAR	LTVS	GLA	74	DVAF	TSHE	HFGL	LCP	109	AGR	RKSA	SSAT	ACT
5	PISG	HVLK	AVFS	RGD	40	WQAR	LTVS	GLAW	TRQ	75	TSHE	HFGL	LCPK	SIP	110	RKSA	SSAT	ACTS	GVM
6	HVLK	AVFS	RGDT	PVL	41	LTVS	GLAW	TRQQ	NQW	76	HFGL	LCPK	SIPG	LSI	111	SSAT	ACTS	GVMT	RGR
7	AVFS	RGDT	PVLP	HET	42	GLAW	TRQQ	NQWK	EPD	77	LCPK	SIPG	LSIS	GNI	112	ACTS	GVMT	RGRL	KAE
8	RGDT	PVLP	HETR	LLQ	43	TRQQ	NQWK	EPDV	YYT	78	SIPG	LSIS	GNI	MNG	113	GVMT	RGRL	KAES	TVA
9	PVLP	HETR	LLQT	GIH	44	NQWK	EPDV	YYTS	AFV	79	LSIS	GNI	MNGQ	QIF	114	RGRL	KAES	TVAP	EED
10	HETR	LLQT	GIHV	RVS	45	EPDV	YYTS	AFVF	PTK	80	GNI	MNGQ	QIFL	EVQ	115	KAES	TVAP	EEDT	DED
11	LLQT	GIHV	RVSQ	PSL	46	YYTS	AFVF	PTKD	VAL	81	MNGQ	QIFL	EVQA	IRE	116	TVAP	EEDT	DEDS	DNE
12	GIHV	RVSQ	PSLI	LVS	47	AFVF	PTKD	VALR	HVV	82	QIFL	EVQA	IRET	VEL	117	EEDT	DEDS	DNEI	HNP
13	RVSQ	PSLI	LVSQ	YTP	48	PTKD	VALR	HVVC	AHE	83	EVQA	IRET	VELR	QYD	118	DEDS	DNEI	HNPA	VFT
14	PSLI	LVSQ	YTPD	STP	49	VALR	HVVC	AHEL	VCS	84	IRET	VELR	QYDP	VAA	119	DNEI	HNPA	VFTW	PPW
15	LVSQ	YTPD	STPC	HRG	50	HVVC	AHEL	VCSM	ENT	85	VELR	QYDP	VAA	FFF	120	HNPA	VFTW	PPWQ	AGI
16	YTPD	STPC	HRGD	NQL	51	AHEL	VCSM	ENTR	ATK	86	QYDP	VAA	FFFD	IDL	121	VFTW	PPWQ	AGIL	ARN
17	STPC	HRGD	NQLQ	VQH	52	VCSM	ENTR	ATKM	QVI	87	VAA	FFFD	IDLL	LQR	122	PPWQ	AGIL	ARNL	VPM
18	HRGD	NQLQ	VQHT	YFT	53	ENTR	ATKM	QVIG	DQY	88	FFFD	IDLL	LQRG	PQY	123	AGIL	ARNL	VPMV	ATV
19	NQLQ	VQHT	YFTG	SEV	54	ATKM	QVIG	DQYV	KVY	89	IDLL	LQRG	PQYS	EHP	124	ARNL	VPMV	ATVQ	GQN
20	VQHT	YFTG	SEVE	NVS	55	QVIG	DQYV	KVYL	ESF	90	LQRG	PQYS	EHPT	FTS	125	VPMV	ATVQ	GQNL	KYQ
21	YFTG	SEVE	NVSV	NVH	56	DQYV	KVYL	ESFC	EDV	91	PQYS	EHPT	FTSQ	YRI	126	ATVQ	GQNL	KYQE	FFW
22	SEVE	NVSV	NVHN	PTG	57	KVYL	ESFC	EDVP	SGK	92	EHPT	FTSQ	YRIQ	GKL	127	GQNL	KYQE	FFWD	AND
23	NVSV	NVHN	PTGR	SIC	58	ESFC	EDVP	SGKL	FMH	93	FTSQ	YRIQ	GKLE	YRH	128	KYQE	FFWD	ANDI	YRI
24	NVHN	PTGR	SICP	SQE	59	EDVP	SGKL	FMHV	TLG	94	YRIQ	GKLE	YRHT	WDR	129	FFWD	ANDI	YRIF	AEL
25	PTGR	SICP	SQEP	MSI	60	SGKL	FMHV	TLGS	DVE	95	GKLE	YRHT	WDRH	DEG	130	ANDI	YRIF	AELE	GVW
26	SICP	SQEP	MSIY	VYA	61	FMHV	TLGS	DVEE	DLT	96	YRHT	WDRH	DEGA	AQG	131	YRIF	AELE	GVWQ	PAA
27	SQEP	MSIY	VYAL	PLK	62	TLGS	DVEE	DLTM	TRN	97	WDRH	DEGA	AQGD	DDV	132	AELE	GVWQ	PAAQ	PKR
28	MSIY	VYAL	PLKM	LNI	63	DVEE	DLTM	TRNP	QPF	98	DEGA	AQGD	DDVW	TSG	133	GVWQ	PAAQ	PKRR	RHR
29	VYAL	PLKM	LNIP	SIN	64	DLTM	TRNP	QPFM	RPHE	99	AQGD	DDVW	TSGS	DSD	134	PAAQ	PKRR	RHRY	DAL
30	PLKM	LNIP	SINV	HHY	65	TRNP	QPFM	RPHE	RNG	100	DDVW	TSGS	DSDE	ELV	135	PKRR	RHRY	DALP	GPC
31	LNIP	SINV	HHYP	SAA	66	QPFM	RPHE	RNGF	TVL	101	TSGS	DSDE	ELVT	TER	136	RHRY	DALP	GPCI	AST
32	SINV	HHYP	SAAE	RKH	67	RPHE	RNGF	TVLC	PKN	102	DSDE	ELVT	TERK	TPR	137	DALP	GPCI	ASTP	KKH
33	HHYP	SAAE	RKHR	HLP	68	RNGF	TVLC	PKNM	IIK	103	ELVT	TERK	TPRV	TGG	138	GPCI	ASTP	KKHR	G
34	SAAE	RKHR	HLPV	ADA	69	TVLC	PKNM	IIKP	GKI	104	TERK	TPRV	TGGG	AMA					
35	RKHR	HLPV	ADAV	IHA	70	PKNM	IIKP	GKIS	HIM	105	TPRV	TGGG	AMAG	AST					

3.7 Antikörper und Peptid/HLA-Multimere

Multimere

Die nicht-konjugierten Multimere wurden mit Pro5 Fluorotag R-PE (ProImmune, Oxford, England) gefärbt.

Multimer	Peptidsequenz	Konjugat	Hersteller
MLW/HLA-A*0201-Pentamer	MLWYTVYNI (U11, HHV-6B)	ohne	ProImmune, Oxford, England
ILY/HLA-A*0201-Pentamer	ILYGPLTRI (U54, HHV-6B)	ohne	ProImmune, Oxford, England
NLV/HLA-A*0201-Tetramer	NLVPMVATV (pp65, CMV)	PE	Beckman Coulter, Krefeld
YSE/HLA-A*0101-Pentamer	YSEHPTFTSQY (pp65, CMV)	ohne	ProImmune, Oxford, England
IPS/HLA-B*3501-Pentamer	IPSINVHHY (pp65, CMV)	ohne	ProImmune, Oxford, England
VLE/HLA-A*0201-Tetramer	VLEETSVML (IE-1, CMV)	PE	Beckman Coulter, Krefeld
VLE/HLA-A*0201-Pentamer	VLEETSVML (IE-1, CMV)	ohne	ProImmune, Oxford, England
QIK/HLA-B*0801-Pentamer	QIKVRVDMV (IE-1, CMV)	ohne	ProImmune, Oxford, England
YVL/HLA-A*0201-Pentamer	YVLDHLIVV (BRLF1, EBV)	ohne	ProImmune, Oxford, England

Antikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugat	Hersteller
CD3	OKT-3	IgG2a	ungekoppelt	Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
CD3	HIT3a	IgG2a	PE-Cy5	BD Pharmingen, Heidelberg
CD4	M-T466	IgG1	FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD4	RPA-T4	IgG1	PE	BD Pharmingen, Heidelberg
CD8	BW 135/80	IgG2a	FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD8 α	RPA-T8	IgG1	APC	BioLegend, San Diego, USA
CD19	HIB19	IgG1	PE-Cy5	BD Pharmingen, Heidelberg
CD45-RA	HI100	IgG2b	PE-Cy5	BD Pharmingen, Heidelberg
CD45-RO	UCHL1	IgG2a	PE-Cy5	BD Pharmingen, Heidelberg
CD56	MEM-188	IgG2a	APC	BioLegend, San Diego, USA
CD62L	DREG-56	IgG1	FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
CCR7	150503	IgG2a	FITC	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
HLA-ABC ("anti-HLA-I")	W6/32	IgG2a	ungekoppelt	Cedarlane, Hornby, Ontario, Kanada
HLA-DR ("anti-HLA-II")	L243		ungekoppelt	
HLA-A2	BB7.2	IgG2a	FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
HLA-B7	BB7.1	IgG1	PE	Chemicon, Melbourne, Australien

3.8 Kits

ELISpot für humanes IFN- γ	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
ELISA für humanes IFN- γ	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
ELISA für humanes IL-2	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
ELISA-Entwickler (AP-Substratkit)	Biorad, München
ELISpot-Entwickler (AP Color kit)	Biorad, München
NucleoSpin Gelpurifikationskit	Macherey Nagel, Düren
Endofree PlasmidMAXI-Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini RNA-Isolationskit	Qiagen, Hilden
TCR V β Repertoire-Kit	Beckman Coulter, Krefeld
(IOtest [®] Beta Mark PN IM3497)	
MACS CD4-Isolationskit	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
MACS CD8-Isolationskit	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
MACS IFN- γ Secretion Assay	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

3.9 Sonstige Reagenzien

Enzyme

Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
MuLV-Reverse Transkriptase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Zytokine

rekombinantes humanes IL-2 (Proleukin [®] S)	Novartis, Basel, Schweiz
rekombinantes humanes IL-4	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
rekombinantes humanes IL-7	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
rekombinantes humanes IL-12	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

Nährmedien und Mediumszusätze

DMEM	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Humanserum Typ AB, 14-490E	Cambrex, Apen
Penicillin/Streptomycin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Trysin / 0,5% EDTA	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Select Agar	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Luria Broth Base	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe

Sonstige Reagenzien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), VWR (Darmstadt) oder Sigma (St. Louis, USA) in Analysequalität bezogen.

DNA Agarose	Biozym, Hess
Select Agar	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Calcein, AM – special packaging	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe

PBS	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Biocoll	Biochrom, Berlin
Protaminsulfat	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
100 bp DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
1kb DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Leiter-MIX	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Probenladepuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
FACSFlow, FACSClean, FACS-Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
RetroNectin	Takara Bio Inc., Shiga, Japan
Cyclosporin A (CsA)	Novartis, Wien
Phytohämagglutinin M (PHA)	Calbiochem, Bad Soden
Ionomycin-Kalziumsalz	Sigma, St. Louis, USA
Tetradecanoylphorbolacetat (TPA)	Sigma, St. Louis, USA
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm, Ulm
Leukozytenkonzentrate aus 500ml Blut	Landesklinik für Blutgruppenserologie und Transfusions- medizin Salzburg, Österreich Uniklinikum Ulm, Abteilung für Transfusionsmedizin
Nabelschnurblut	LMU-Klinikum Großhadern, Entbindungsstation

3.10 Dienstleistungen

DNA-Sequenzierungen	Sequiserve, Vaterstetten
HLA-Typisierung	IMG, Labor Dr. Klein, Martinsried
Virusserologie	Max-von-Pettenkofer-Institut, München

3.11 Computerprogramme und Internetseiten

Auswertung von FACS-Daten	CellQuest™ Pro (BD Pharmingen, San Diego, USA) FlowJo 8.8.4 (Tree Star, Ashland, USA)
Auswertung von DNA-Sequenzen und Planung von Klonierungen	MacVector 10.0 (MacVector, Inc., Cary, USA)
Auswertung von Elektropherogrammen (DNA-Sequenzierung)	FinchTV, Version 1.4 (Geospiza, Seattle, USA)
Analyse der TCR-Sequenzen	IMGT/V-QUEST (http://imgt.cines.fr/)
Berechnung von Standardkurven (ELISA)	KC4 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA)
Datenanalyse und Darstellung	Excel® 2004 for Mac, Version 11.5.2 (Microsoft Corporation)
Bildbearbeitung	Photoshop® CS (Adobe, San José, USA) FreeHand® MX, Version 11.0.1 (Macromedia Inc., San Francisco, USA)
Textbearbeitung	Word® 2004 for Mac, Version 11.5.0 (Microsoft Corporation)
Epitop-Prädiktionsalgorithmen	SYFPEITHI (http://www.syfpeithi.de/) BIMAS (http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)

3.12 Verbrauchsmaterial

Flachbodenplatten (6-/12-/24-/96-Well)
 96-Well-Rundbodenplatten
 96-Well-Spitzbodenplatten
 FACS-Röhrchen
 Kryoröhrchen
 MaxiSorp® ELISA-Platten
 MultiScreen™-HA ELISpot-Platten
 PCR-Reaktionsgefäße
 Pipetten (2 ml/5 ml/10 ml/25 ml)

Pipettenspitzen TowerPack
 (0,1-10 µl/10-200 µl/100-1000 µl)
 Reaktionsgefäß, 1,5 ml
 Röhrchen (13 ml/15 ml/50 ml)
 Spritzen, 50 ml (Infuject)
 Sterilfilter (0,22 µm/0,45 µm)
 Zellkulturflaschen

BD Falcon, Heidelberg
 Nunc, Wiesbaden
 Hartenstein, Würzburg
 BD Falcon, Heidelberg
 Nunc, Wiesbaden
 Nunc, Wiesbaden
 Millipore, Schwalbach
 Abgene, Hamburg
 Greiner Bio-One, Kremsmünster,
 Österreich
 Gilson International, Limburg-Offheim

Eppendorf, Hamburg
 BD Falcon, Heidelberg
 Dispomed, Gelnhausen
 Millipore, Schwalbach
 Nunc, Wiesbaden

3.13 Geräte

Agarosegelkammer
 Axiovert 10 Fluoreszenzmikroskop
 Bestrahlungsanlage Gammacell 40 (Cs-137)
 Bezugsdatum: 15.06.1979; 125,8 R/min
 Halbwertszeit: 30 Jahre
 Brutschrank CO₂-AUTO-ZERO
 Brutschrank CO₂-Unitherm 170
 Eismaschine AF 200
 ELISA-Reader EL-800 Universal Microplate Reader
 FACS Calibur Durchflussszytometer
 Heiz-/Rührplatte
 Inkubationsschüttler innova 4400
 Mehrkanalpipette
 Mehrkanalpipette
 Mikroskop
 Mikrowelle Compact Microwave Oven
 Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer
 Neubauer-Zählkammer
 PCR-Cycler Mastercycler
 PCR-Roboter Robocycler Gradient 96
 pH-Meter
 Pipetboy acu
 Pipetten
 Reinstwassersystem Aquintus
 Sterilbank
 Taumelrollermischer TRM 50
 Thermomixer compact
 Tischzentrifuge Centrifuge 5415 R
 Tischzentrifuge PICO 21 centrifuge
 UV-Transilluminator
 Wallac Victor² 1420 Multilabel-Counter
 Wasserbad
 Zentrifuge Avanti J-26 XP
 Zentrifuge Multifuge 3 L-R

Peqlab Biotechnologie, Erlangen
 Zeiss, Jena
 Atomic energy of Canada limited,
 Ottawa, Kanada
 Heraeus Holding, Hanau
 UniEquip, Martinsried
 Scotsman, Vernon Hills, USA
 BIO-TEK Instruments, Bad Friedrichshall
 Becton Dickinson, Heidelberg
 Thermo Scientific, Waltham, USA
 New Brunswick Scientific, Edison, USA
 Brand, Wertheim
 Dunn Labortechnik, Asbach
 Zeiss, Jena
 Lloyds
 PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
 Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
 Eppendorf, Hamburg
 Stratagene, La Jolla, USA
 WTW, Weilheim
 Integra Biosciences, Fernwald
 Gilson International, Limburg-Offheim
 MembraPure, Bodenheim
 BDK, Sonnenbühl-Genkingen
 IDL, Nidderau
 Eppendorf, Hamburg
 Eppendorf, Hamburg
 Heraeus Holding, Hanau
 Peqlab Biotechnologie, Erlangen
 PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
 Memmert, Schwabach
 Beckman Coulter, Krefeld
 Heraeus Holding, Hanau

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Allgemeines

Arbeiten mit DNA:

Grundlegende molekularbiologische Methoden, wie die Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* durch alkalische Lyse und Affinitätsmatrix-Reinigung (Plasmidpräparationskits von Qiagen), die Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, enzymatische Restriktionshydrolysen, die Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase, die Ligation freier DNA-Enden sowie die Auftrennung und Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden gemäß Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook, 2001).

Arbeiten mit Bakterien:

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der *E.coli*-Laborstamm DH5 α verwendet.

Bakterien wurden unmittelbar aus gefrorenen Stammkulturen auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Zur Anzucht von Flüssigkulturen wurde eine einzelne auf der LB-Agarplatte gewachsene Bakterienkolonie verwendet. Plasmide tragende Bakterien wurden unter Selektionsbedingungen mit dem entsprechenden Antibiotikum (im Rahmen dieser Arbeit immer Ampicillin 100 μ g/ml) kultiviert. Zum Anlegen von Stammkulturen wurden bis zur Sättigung gewachsene Flüssigkulturen mit 50% Glycerol versetzt und bei -80°C eingefroren und gelagert.

Chemisch-kompetente Bakterien wurden mit Hilfe der RbCl₂-Methode hergestellt (Hanahan, 1983). Zur Transformation der chemisch-kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA wurde die Hitzeschock-Methode angewendet (Hanahan, 1983).

4.1.2 Analyse von B-Zelllinien auf Anwesenheit von EBV-Sequenzen

Bei jeder im Rahmen dieser Arbeit neu etablierten B-Zelllinie (CD40-aktivierte B-Blasten, LCL oder mLCL) wurde durch PCR die An- bzw. Abwesenheit von EBV-spezifischen und mini-EBV-spezifischen Sequenzen überprüft. Zum Nachweis von EBV-spezifischen Sequenzen wurden Primer, die spezifisch das Gen für das virale Glykoprotein gp85 amplifizieren, ausgewählt (Produktgröße: 461 bp). Dieses Gen ist sowohl in Wildtyp-EBV-Stämmen wie auch im EBV-Laborstamm B95.8, jedoch nicht in mini-EBV-Vektoren enthalten und eignet sich somit zum Nachweis von mit endogenem EBV oder B95.8-EBV transformierten B-Zellen. Um mini-EBV-spezifische Sequenzen nachzuweisen, wurden Oligonukleotide spezifisch für das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (Produktgröße: 294 bp), welches in mini-EBV-Vektoren, jedoch nicht in Wildtyp-EBV oder EBV B95.8 enthalten ist, verwendet.

Für die Analyse von neu hergestellten LCLs und mLCLs wurden die beiden Primerpaare im Verhältnis 1:1 in der gleichen Reaktionsmischung eingesetzt. Zum Nachweis der Abwesenheit von

EBV in neu etablierten B-Blastenlinien wurden die gp85-spezifischen Oligonukleotide verwendet. Außerdem wurde der Reaktionsmischung im 10-fachen Überschuss Primer zur spezifischen Amplifikation des β -Globin-Gens (Produktgröße: 260 bp) beigemischt, um die grundsätzliche Amplifizierbarkeit von genomischen DNA-Sequenzen im Falle der Abwesenheit einer EBV-spezifischen DNA-Amplifikation zu überprüfen. Das PCR-Protokoll bestand jeweils aus 30 Amplifikationszyklen mit jeweils 45 Sekunden Denaturierung bei 96°C, Primerhybridisierung bei 59°C und Elongation bei 72°C.

Zur Aufbereitung der Zelllinien für die PCR-Analyse wurden die Zellen alkalisch lysiert. Dazu wurde der wachsenden Zellkultur eine Probe mit etwa 0,1-1 Million Zellen entnommen, in ein 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Das Kulturmedium wurde vollständig abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 25 μ l 50 mM NaOH resuspendiert und dadurch lysiert. Das Lysat wurde mit drei Tropfen Mineralöl abgedeckt und die Probe 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Probe wurde das Zelllysate mit 4 μ l 1 M Tris/HCl (pH 7) neutralisiert. Die Probe wurde kurz zentrifugiert (1 Minute bei Maximalgeschwindigkeit), um eventuell ausgefällte Partikel abzusetzen, und von der überstehenden Lösung wurde 1 μ l pro PCR-Reaktionsansatz (50 μ l) eingesetzt.

4.1.3 Analyse des T-Zellrezeptors

Die PCR-Analyse des TCRs der CMV-spezifischen T-Zellklone wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Roth et al., 1989). Dazu wurde die gesamte RNA des jeweiligen T-Zellklons mit Hilfe des RNeasy Mini-Kits (Qiagen, Hilden) extrahiert und durch reverse Transkription mit MuLV-reverse Transkriptase und oligo-dT-Primer cDNA hergestellt. Mittels 34 verschiedener V_{α} -Primer (Steinle et al., 1995) wurde eine subfamilienspezifische PCR der TCR α -Kette durchgeführt. Die TCR β -Kette wurde mit Hilfe von 37 verschiedenen V_{β} -Primern (Steinle et al., 1995) bzw. mit degenerierten V_{β} -Primern (Zhou et al., 2006) untersucht. Die spezifisch amplifizierten DNA-Produkte wurden durch Sequenzierung analysiert. Zur Bestimmung der verwendeten TCR-Gensegmente und CDR3-Regionen wurde das Programm V-QUEST von IMGT verwendet.

4.1.4 Klonierung des T-Zellrezeptors in den retroviralen Vektor MP71Gpre

Um die CMV-spezifischen T-Zellrezeptoren mittels retroviralem Transfer in sekundäre Zellen einbringen zu können, wurden die Gene der TCR α - und β -Ketten in den vom Retrovirus Myeloproliferatives Sarkomvirus (MPSV)-abgeleiteten Vektor MP71Gpre eingebracht (Abbildung 4-1). Dazu wurden die TCR α - und β -Gene von der isolierten cDNA mit spezifischen Primern, die 5'-*Not* I- und 3'-*Eco*R I-Restriktionsschnittstellen sowie eine Kozak-Sequenz (CCACCATGG) um das Startkodon ATG enthielten, amplifiziert. Die TCR α - und β -Gene wurden über diese *Not* I- und *Eco*R I-Schnittstellen separat in den Vektor MP71Gpre eingebaut, so dass dadurch das im Vektor enthaltene GFP-Gen ausgetauscht wurde. Alle so hergestellten TCR-Kassetten wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft.

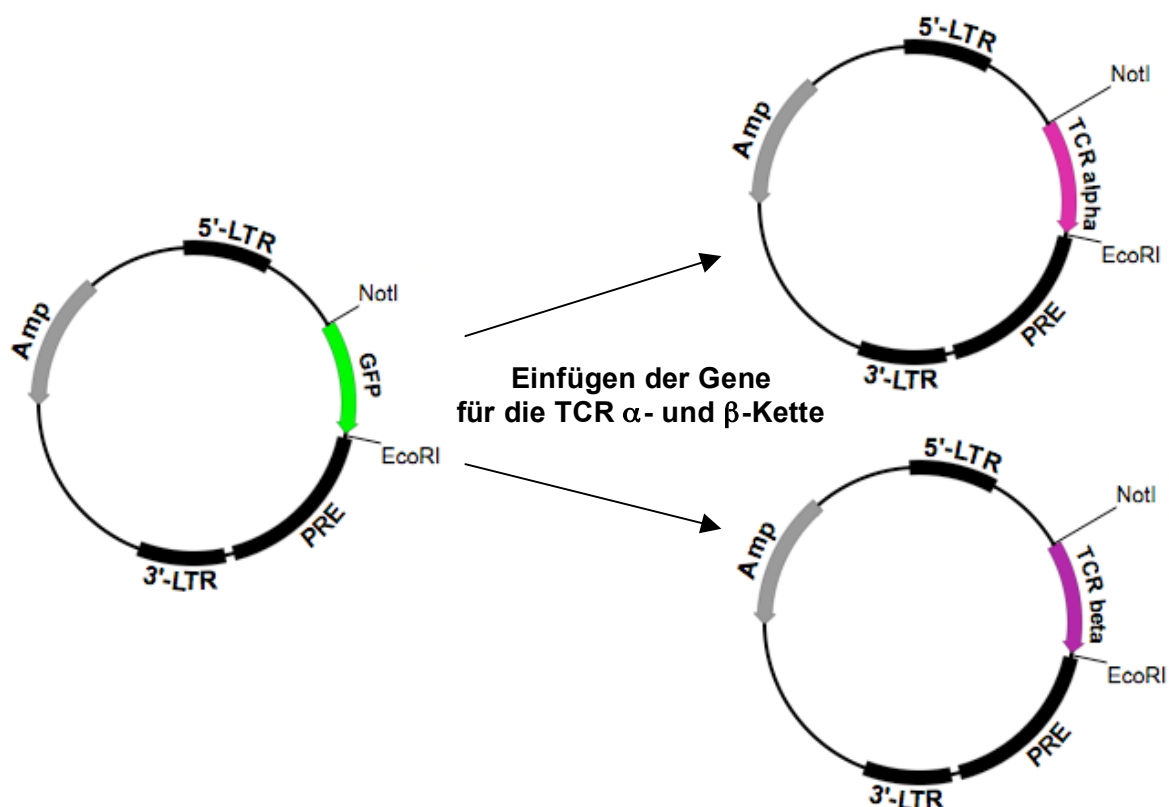


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Klonierung der retroviralen Vektoren zum TCR-Gentransfer. Die Gene für die TCR α - und β -Kette wurden durch enzymatische Spaltung mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* separat in den retroviralen Vektor MP71Gpre eingebracht, wobei das vorhandene GFP-Gen ersetzt wurde. Amp: Ampicillinresistenzgen; LTR: *long terminal repeats*; PRE: posttranskriptionelles regulatorisches Element aus dem Murmeltier-Hepatitisvirus.

4.1.5 Klonierung der HHV-6B-Gene U11 und U54 in den Expressionsvektor pCMV2-FLAG

Für die transiente Expression der HHV-6B-Proteine U11 und U54 in den HLA-A2-positiven 293T-Zellen mussten die entsprechenden Gene in den Expressionsvektor pCMV2-FLAG eingebracht werden. Nachdem das U11-Protein mit 858 Aminosäuren relativ groß ist, wurden noch zwei weitere Plasmide zur Expression der ersten 214 bzw. 435 Aminosäuren des U11-Proteins hergestellt. Das verwendete Plasmid pCMV2-FLAG erlaubt die Expression der HHV-6B-Proteine und Proteinfragmente mit einem N-terminalen Flag-Epitop unter Kontrolle des starken CMV-Promotors. Aus HHV-6B (HST)-infizierten Nabelschnur-PHA-Blasten wurde die gesamte RNA isoliert und mit Hilfe von MuLV-reverser Transkriptase und oligo-dT-Primer wurde cDNA hergestellt. Die HHV-6B-Gene U11 und U54 wurden durch spezifische Primer, die 5'-*NotI* bzw. 5'-*HindIII*- und 3'-*BamHI*-Schnittstellen enthielten, von der cDNA amplifiziert. Die mit den Enzymen *NotI* und *BamHI* bzw. *HindIII* und *BamHI* verdauten HHV-6B-Gene wurden in den mit den gleichen Enzymen aufgeschnittenen Vektor inseriert. Die Expressionskassetten aller auf diese Weise hergestellten Plasmide wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

4.2 Zellkulturmethoden

4.2.1 Allgemeines

Alle Zellen wurden in einem Inkubator mit einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Standardmedium für alle Suspensionszelllinien und für die CD40L-Zellen war RPMI-1640 supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 nM Na-Selenit. Die 293T-Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) mit den gleichen Zusätzen kultiviert.

Mini-lymphoblastoide Zelllinien (mini-LCLs) und LCLs wurden durch Infektion von PBMCs mit den B-Zell-transformierenden mini-EBV-Vektoren bzw. EBV-haltigem B95.8-Zellkulturüberstand in Anwesenheit von 1 µg/ml Cyclosporin A (CsA) hergestellt (Moosmann et al., 2002). Nach etwa 4-6-wöchiger Kulturphase wurden die LCL und mLCLs ohne CsA weiterkultiviert und die Anwesenheit von EBV bzw. mini-EBV mittels PCR analysiert. Die Zellen wurden je nach Proliferation der Kultur ein- bis zweimal wöchentlich 5-10-fach expandiert.

CD40-aktivierte B-Blasten (BBL) wurden durch Kultur von primären B-Zellen auf CD40-Ligand-exprimierenden L-Zellen (L / CD40L) hergestellt und aufrechterhalten (Wiesner et al., 2008). Die CD40L-Stimulatorzellen wurden mit 140 Gy bestrahlt und je 1 Mio. pro 12-Well- bzw. 96-Well-Platte ausplattiert. Diese Platten wurden 2-7 Tage später für die Herstellung bzw. Kultivierung der BBL verwendet. Dazu wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) zu 2,5, 5 oder 10×10⁴/Well in einer 96-Well-Stimulatorzellplatte in Anwesenheit von 2 ng/ml IL-4 und 1 µg/ml CsA verteilt. Zwei bis vier Zellkulturen wurden pro Zellzahl angesetzt. Alle 7 Tage wurden die Zellen auf neue Stimulatorzellplatten überführt. Dicht gewachsene Zellkulturen wurden 2-4-fach expandiert, nicht so gut gewachsene Kulturen wurden ohne Expansion auf neue Platten überführt. Nach etwa 4-6 Wochen wurden die BBL-Kulturen ohne CsA weiterkultiviert. Nach einer ähnlichen Zeitspanne wurden die BBL mittels PCR auf EBV-Freiheit getestet. Die etablierten EBV-freien BBL wurden standardmäßig in einer 12-Well-CD40L-Platte kultiviert.

Die Kultivierung von primären humanen T-Zellen ist unter 4.2.3 (ab Seite 38) und 4.2.4 (ab Seite 39) beschrieben.

Die TCR-defizienten T-Zelllinien J76 und J76CD8 wurden in RPMI-1640-Standardmedium kultiviert und zweimal pro Woche 5-10-fach expandiert.

Die MHC I-defiziente K562-Zelllinie diente als Negativkontrolle in T-Zellanalysen und wurde in RPMI-1640-Standardmedium kultiviert. Je nach Proliferation wurde die Zellkultur ein- bis zweimal wöchentlich 5-10-fach expandiert.

Die adhärent wachsenden 293T-Zellen wurden zweimal wöchentlich durch Abklopfen von der Zellkulturflasche gelöst, pelletiert und in frischem DMEM-Standardmedium 10-15-fach expandiert.

Die adhärent wachsenden L / CD40L-Zellen wurden einmal pro Woche mit PBS serumfrei gewaschen, durch 5-10-minütige Inkubation in Trypsin/EDTA bei 37°C von der Zellkulturflasche gelöst und abzentrifugiert. Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden nach 30-facher Expansion in RPMI-1640-Standardmedium weiterkultiviert.

Zellpelletierungen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei $300 \times g$ und Raumtemperatur durchgeführt.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension mit einem gleichen Volumen einer 0,5%-igen Trypanblau-Lösung gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind daher im Mikroskop von den vitalen Zellen zu unterscheiden. Frisch isolierte PBMCs wurden nach Vorbehandlung mit einem Volumen Türcklösung (0,01% Kristallviolett, 1% Essigsäure) gezählt. Die eventuell noch als Verunreinigung in der PBMC-Präparation enthaltenen Erythrozyten werden durch die saure, hypotone Lösung lysiert. Noch nicht fragmentierte Zellen, die jedoch schon eine nicht mehr intakte Membranstruktur aufweisen, werden durch den Farbstoff Kristallviolett angefärbt und sind so im Mikroskop von den Lymphozyten zu unterscheiden.

Zur Lagerung wurden die Zellen in Gegenwart von Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zum Einfrieren wurden die Zellen abzentrifugiert, in 1 ml kaltem Einfriermedium (50% fötales Kälberserum, 40% Zellkulturmedium, 10% DMSO) resuspendiert und in ein 2-ml-Kryoröhrchen überführt. Um die Zellen schonend abzukühlen, wurden die Zellen zuerst kurz auf Eis gekühlt und dann in ein allseitig verschlossenes Styroporbehältnis gegeben und bei -80°C tiefgefroren. Einige Tage später wurden die Röhrchen zur Dauerlagerung in der Gasphase über flüssigem Stickstoff in den entsprechenden Lagertank überführt.

Zur Rekultivierung der kryokonservierten Zellen wurde der gefrorene Röhrcheninhalt durch Resuspension mit warmen Kulturmedium (37°C) möglichst schnell aufgetaut und in mindestens 30 ml Kulturmedium verdünnt und abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in Medium resuspendiert und kultiviert.

4.2.2 Isolation von primären humanen Lymphozyten

Als Quelle für primäre humane Lymphozyten dienten (a) frisch abgenommenes venöses Blut freiwilliger erwachsener Spender, (b) Leukozytenkonzentrate (*Buffy coats*) oder (c) Nabelschnurblut.

In einem 50-ml-Röhrchen wurden jeweils 35 ml Blut bzw. Blutkonzentrat (vorher mindestens 1:1 mit PBS verdünnt) mit 14 ml Ficoll-Trennlösung der Dichte 1,07 ("Biocoll", Biochrom AG, Berlin) unterschichtet. Durch Zentrifugation ($1000 \times g$, 25 min) wird die Anreicherung von Monozyten, B- und T-Lymphozyten im Grenzbereich zwischen schwerer und leichter Flüssigkeitsphase erreicht. Diese Fraktion der mononukleären Zellen, bei Gewinnung aus peripherem Blut PBMCs (*peripheral*

blood mononuclear cells) genannt, wurde abgenommen, 4-6mal mit PBS gewaschen und als Ausgangsmaterial für die Herstellung von B- und T-Zelllinien verwendet.

4.2.3 Herstellung polyklonaler T-Zelllinien

4.2.3.1 PHA-Blasten

Durch Stimulation primärer T-Zellen aus Nabelschnurblut oder peripherem venösem Blut mit dem T-Zellaktivator Phytohämagglutinin M (PHA) werden die T-Zellen unabhängig von ihrer Antigenpezifität aktiviert und sind so über einen kurzen Zeitraum (2-3 Wochen) kultivierbar. Zur Herstellung der sogenannten PHA-Blasten wurden 2×10^6 /Well frisch isolierte oder aufgetaute primäre T-Zellen in 2 ml Medium in einer 24-Well-Platte mit 5 µg/ml PHA kultiviert. Die proliferierenden Zellen wurden etwa alle drei Tage expandiert.

4.2.3.2 CMV-spezifische T-Zellen

Als Quelle zur Herstellung CMV-spezifischer T-Zelllinien dienten frisch isolierte oder kryokonservierte PBMCs CMV-positiver Spender. Die virusspezifischen Gedächtnis-T-Zellen wurden durch antigenspezifische Stimulation *in vitro* angereichert.

Stimulation mit CMV-antigenexprimierenden mLCLs

Durch Stimulation mit der autologen pp65- bzw. IE-1-exprimierenden mLCL können pp65- bzw. IE-1-spezifische Gedächtnis-T-Zellen mit diversen CMV-Epitopspezifitäten eines beliebigen CMV-positiven Spenders hergestellt werden. Der Vorteil dieser Stimulationsmethode besteht darin, dass endogen prozessiertes Antigen verwendet wird. Die durch intrazelluläre Prozessierung entstandenen CMV-Peptide werden auf die verschiedenen HLA-Moleküle des Spenders geladen und gegenüber den T-Zellen präsentiert. Es findet also keine Anreicherung eines auf ein bestimmtes HLA-Allel eingeschränkten T-Zellrepertoires statt.

Pro Well einer 12-Well-Platte wurden 6×10^6 PBMCs zusammen mit $1,5 \times 10^5$ Zellen der bestrahlten (50 Gy) autologen pp65-exprimierenden mLCL in 3 ml Medium kokultiviert. Am Tag 10 und daraufhin alle 7 Tage wurden die Zellen geerntet, gezählt und zu 3×10^6 /Well in 3 ml Medium auf frische 12-Well-Platten verteilt. Es wurden bestrahlte (50 Gy) autologe pp65-mLCLs als Stimulatoren in einem Effektor:Stimulator-Verhältnis von 3:1 sowie 100 U/ml rekombinantes IL-2 zugegeben. Nach der gewünschten Anreicherung der CMV-spezifischen Zellen wurde eine Einzelzellklonierung durchgeführt.

Durch Stimulation mit der pp65-exprimierenden mLCL wurden pp65-spezifische T-Zellen des Spenders MD angereichert, wodurch in Folge der anschließenden Klonierung YSE-, RPH- und KYYL-spezifische T-Zellklone etabliert werden konnten. Durch Stimulation mit der IE-1-exprimierenden mLCL wurden IE-1-spezifische Zellen des gleichen Spenders angereichert, was die Herstellung QIK-spezifischer T-Zellklone ermöglichte. Durch Stimulation mit der IE-1-positiven mLCL des Spenders F61 wurden VLE-spezifische T-Zelllinien hergestellt.

Stimulation mit CMV-Peptid

Durch Stimulation mit einem bestimmten CMV-Peptid gelingt es, möglichst schnell CMV-spezifische T-Zellen einer bestimmten Epitopspezifität anzureichern. Als antigenpräsentierende Zellen können hierbei die PBMCs selbst (an Tag 0 der Stimulation) oder autologe fremdantigenfreie BBL verwendet werden.

Die PBMCs wurden mit 5 µg/ml des entsprechenden CMV-Peptids beladen und zu 8×10^6 /Well in 4 ml Medium auf einer 12-Well-Platte verteilt. Nach 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und wieder auf die Zellkulturplatte verteilt. Dabei wurde 10 U/ml IL-2 zugegeben. An Tag 8 wurde die IL-2-Konzentration auf 50 U/mL erhöht. Die T-Zellkultur wurde je nach Zellproliferation expandiert. An Tag 14 wurden durch Einzelzellklonierung monoklonale T-Zelllinien hergestellt.

Mit Hilfe dieser Stimulationsmethode wurden die NLV-spezifischen T-Zelllinien der Spender JG und RZ sowie die IPS-spezifische T-Zelllinie des Spenders BF hergestellt.

4.2.3.3 HHV-6-spezifische T-Zellen

Zur Anreicherung von HHV-6-spezifischen T-Zellen wurden PBMCs HHV-6-positiver Spender verwendet. Die HHV-6-spezifischen T-Zellen wurden mit Hilfe der vorhergesagten HHV-6-Epitoppeptide (Tabelle 5-IV) stimuliert. Dabei wurden verschiedene Protokolle miteinander verglichen, was detailliert unter Kapitel 5.2.2 (ab Seite 72) beschrieben ist.

Generell wurden die PBMCs an Tag 0 mit einem oder mehreren HHV-6-Peptiden und eventuell zusätzlich mit EBV-Peptiden beladen (jeweils 1 µg/ml, 2 h, 37°C). Die überschüssigen Peptide wurden durch mehrmaliges Waschen der Zellen mit PBS entfernt und die Zellen wurden zu 5×10^6 /Well in 2 ml in einer 12-Well-Platte ausgesät. Nach 6-10 Tagen und dann alle 7 Tage wurden die Zellen eingesammelt, gezählt und erneut zu 3×10^6 /Well in 2 ml in einer 12-Well-Platte ausgesät. Als Stimulatorzellen wurden bestrahlte (50 Gy), mit den entsprechenden Peptiden beladene autologe BBL in einem Effektor:Stimulator-Verhältnis von 4:1 zugegeben. Je nach Proliferation wurden die T-Zelllinien zwischen den Stimulationen mit frischem Medium expandiert. Es wurden außerdem zu bestimmten Zeitpunkten die Zytokine IL-2 oder IL-7 und IL-12 zugegeben. Die genauen Konzentrationen und Zeitpunkte der Zytokinzugabe sind in Kapitel 5.2.2 (ab Seite 72) beschrieben.

4.2.4 Herstellung monoklonaler T-Zelllinien

Aus polyklonalen antigenspezifischen T-Zellkulturen wurden durch limitierende Verdünnung T-Zellklone hergestellt. Dazu wurden je polyklonaler T-Zelllinie die Zellen in jeweils fünf 96-Rundbodenplatten mit einer T-Zellverdünnung von 0,5-0,7 Zellen pro Well und fünf Platten mit einer T-Zellverdünnung von 3 Zellen pro Well ausgesät. 2×10^4 /Well der bestrahlten (50 Gy) LCL oder mLCL (falls vorhanden, die autologe oder zur HLA-Restriktion der erwarteten T-Zellklone

passende antigenexprimierende mLCL), 3×10^5 /Well einer Mischung aus bestrahlten (50 Gy) allogenen PBMCs von drei verschiedenen Spendern und 1000 U/ml IL-2 wurden dazugegeben. Nach drei bis vier Wochen wurde die Spezifität der sichtbar gewachsenen T-Zellklone analysiert. Die gewünschten T-Zellklone wurden in 96-Rundbodenplatten unter den selben Bedingungen expandiert und alle zwei Wochen ebenfalls unter den gleichen Bedingungen restimuliert.

4.2.5 Phänotypisierung von Zellen mittels Durchflusszytometrie

Einzelzellen einer Zellsuspension können mittels Durchflusszytometrie in einem FACS™-Gerät analysiert werden. Nach Färbung von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern oder multimeren Peptid/HLA-Klasse-I-Komplexen (Peptid/HLA-Multimere) kann man durch durchflusszytometrische Analyse auf Basis einzelner Zellen bestimmen, wie viele Zellen innerhalb einer Zellkultur ein bestimmtes Protein exprimieren und welches relative Expressionsniveau auf der Oberfläche erreicht wird. Auch die Expression eines fluoreszierenden Proteins, wie z.B. GFP, kann durch FACS-Analyse untersucht werden.

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden etwa 3×10^5 Zellen pro Färbung eingesetzt und, wenn nicht anders angegeben, 1×10^5 Ereignisse im Durchflusszytometer vermessen. Zur Färbung mit Peptid/HLA-Multimeren wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur mit dem PE-markierten Peptid/HLA-Tetramer oder unmarkierten Peptid/HLA-Pentamer inkubiert. Die Zellen wurden auf Eis für 15 min mit Antikörper gegen verschiedene Oberflächenantigene (anti-CD4-FITC, anti-CD3-PE-Cy5, anti-CD8-APC, anti-CD4-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD19-PE-Cy5, anti-CD62L-FITC, anti-CCR7-FITC) und, im Falle des unmarkierten Pentamers, mit Pro5 Fluorotag R-PE gegengefärbt und direkt nach der Färbung mit 1,6% Formaldehyd fixiert. Die Zellen wurden an einem Becton Dickinson FACSCalibur Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden mit Hilfe der FlowJo 8.8.4-Software ausgewertet. Zur weiteren Analyse wurden die vitalen Lymphozyten durch ihre charakteristische Position in dem zweidimensionalen Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht-Diagramm vorausgewählt. Alle in dieser Arbeit gezeigten Punktdiagramme umfassen eine Spannbreite von 1 bis 10.000 willkürliche Einheiten der Fluoreszenzintensität in einer logarithmischen Skala.

4.2.6 Magnetische Separation von Zellpopulationen

Zur Isolation von CD4- oder CD8-positiven sowie IFN- γ -sezernierenden Zellen aus einer Zellkultur wurde das auf magnetischer Separation beruhende MACS (*magnetic cell sorting*)-Verfahren von Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach) verwendet. Zur Markierung der Zellen werden dabei spezifische monoklonale Antikörper verwendet, die an superparamagnetische etwa 50 nm große Partikel gekoppelt sind. In einer mit paramagnetischer Matrix ausgekleideten Säule, die sich in einem starken magnetischen Feld befindet, werden die Zellen durch die an der Zelloberfläche gebundenen Antikörper in der Säule magnetisch festgehalten. Die unmarkierten Zellen werden von der Säule gewaschen. Durch Entfernen des Magnetfeldes können die markierten Zellen eluiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen mit Hilfe der Isolationskits für humane CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen der Firma Miltenyi Biotec nach Herstellerangaben isoliert. Die erhaltenen Zellfraktionen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Zur Separation der T-Zellen, die nach antigenspezifischem Stimulus IFN- γ freisetzen, wurde der IFN- γ -Freisetzungskit gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet. Hierbei wurden die T-Zellen antigenspezifisch stimuliert. Nach Über-Nacht-Inkubation wurden die Zellen mit einem bispezifischen Antikörper, der über CD45 an die T-Zelloberfläche bindet und dort zusätzlich das von der T-Zelle freigesetzte IFN- γ binden kann, markiert ("*catch reagent*"). Anschließend wurden die T-Zellen für 45 min bei 37°C inkubiert, um die Bindung des innerhalb dieser Zeit freigesetzten IFN- γ an den bispezifischen Antikörper zu ermöglichen. Nun wurden die Zellen mit einem zweiten IFN- γ -spezifischen Antikörper, der an ein magnetisches Partikel gekoppelt war, inkubiert. Die so markierten Zellen wurden dann im Magnetfeld abgetrennt und isoliert. Auch hier wurde die Separation durchflusszytometrisch überprüft.

4.2.7 ELISA zur Quantifizierung von Zytokinen

Zur Bestimmung der Aktivierung spezifischer T-Zellen wurden die T-Zellen mit antigen-präsentierenden Zellen über Nacht kokultiviert und zur Quantifizierung der freigesetzten Effektorzytokine IFN- γ und IL-2 wurde ein ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) durchgeführt.

Standardmäßig wurden je Ansatz 10⁴ Effektorzellen mit 2×10⁴ Zielzellen in 200 μ l/Well einer 96-Well-Spitzbodenplatte über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kokultiviert. Am nächsten Tag wurde zur Detektion der freigesetzten Effektorzytokine ein IFN- γ - bzw. IL-2-ELISA durchgeführt. Dazu wurde der entsprechende Antikörper-Kit der Firma Mabtech (Nacka Strand, Schweden) nach Herstellerangaben verwendet. 96-Well-ELISA-Platten wurden dabei über Nacht mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes IFN- γ bzw. IL-2 bei 4°C beschichtet, anschließend mit PBS gewaschen und für 30 min mit Standardmedium (enthält 10% FKS) blockiert. Die Überstände der Kokulturen (je 50 μ l) wurden auf die vorbehandelten Platten überführt und für 2 h inkubiert. Nun wurde ein zweiter IFN- γ - bzw. IL-2-spezifischer Antikörper, der mit Biotin gekoppelt war, für eine Stunde zugegeben. Die anschließend zugegebene Streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase (AP) band an das Biotin und wurde durch eine AP-Substratlösung (Kit der Firma Biorad oder verdünnte selbsthergestellte Lösung (5-fach konzentriert: 50% Diethanolamin, 5 mg/ml *p*-NPP, 0,5 mM MgCl₂·6 H₂O, pH 9,5) nachgewiesen. Das in der Lösung enthaltene *p*-Nitrophenylphosphat (*p*-NPP) wurde durch die AP zum gelben *p*-Nitrophenol umgesetzt und die Farbentwicklung konnte bei 405 nm photometrisch detektiert werden. Zur Quantifizierung der Zytokinmenge wurde eine Standardkurve verwendet. Zwischen den Antikörperinkubationsschritten wurde die ELISA-Platte jeweils viermal mit 0,05% Tween-20 in PBS gewaschen.

4.2.8 ELISpot zur Quantifizierung IFN- γ -sezernierender Zellen

Die ELISpot-Technik ermöglicht es, die Zytokinproduktion einzelner Zellen zu detektieren und so die Anzahl zytokinproduzierender Zellen innerhalb einer Zellkultur zu bestimmen (Versteegen et al., 1988). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der IFN- γ -ELISpot-Kit der Firma Mabtech (Nacka Strand, Schweden) gemäß den Herstellerangaben zur Quantifizierung HHV-6-spezifischer T-Zellen verwendet. Hierbei wurden die zu analysierenden Zellen in einer mit Nitrozellulosemembran versehenen 96-Well-ELISpot-Platte, die vorher mit IFN- γ -Antikörper beschichtet worden war, über Nacht mit dem entsprechenden HHV-6-Peptid (auf antigenpräsentierende Zellen geladen oder direkt zu den T-Zellen gegeben) kultiviert. Als Effektorzellen wurden je Stimulationsansatz 2×10^5 frisch isolierte PBMCs oder $1-5 \times 10^4$ kultivierte T-Zellen eingesetzt. Es wurden entweder direkt 1 $\mu\text{g/ml}$ des entsprechenden Peptids oder $2-5 \times 10^4$ /Well vorher mit HHV-6-Peptid beladene Stimulatorzellen zugegeben. Das Gesamtvolumen pro Well war 200 μl . Die pan-T-Zellaktivatoren TPA (Tetradecanoylphorbolacetat, 100 ng/ml)/Ionomycin (1 μM) und PHA (Phytohämagglutinin M; 10 $\mu\text{g/ml}$) wurden als Positivkontrollen eingesetzt. Die Detektion der IFN- γ -freisetzenden Zellen erfolgte ähnlich zum ELISA durch Inkubation mit einem zweiten biotinylierten, IFN- γ -spezifischen Antikörper. Die anschließend zugegebene Streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase band an das Biotin und wurde mittels BCIP/NPT (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitrotetrazolblauchlorid)-Substrat nachgewiesen. Auf der Membran bildeten sich blaue Punkte, die ausgezählt werden konnten.

4.2.9 Zytotoxizitätsanalyse

Die Zytotoxizität der TCR-transduzierten T-Zellen wurde mit Hilfe des Calceinfreisetzungstests analysiert. Dabei wurden die Zielzellen (etwa $1-2 \times 10^6$) mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Calceinacetoxymethylester (Calcein AM) in 500 μl Medium für 30 min bei 37°C gefärbt, dreimal mit PBS gewaschen und zu 5.000 Zellen pro 100 μl und Well auf eine 96-Well-Spitzbodenplatte verteilt. Die T-Zellen wurden in 100 μl /Well in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Nach 4-5 h bei 37°C wurden jeweils 150 μl /Well des Überstands auf eine 96-Flachbodenplatte überführt und die Menge an freigesetztem fluoreszierenden Calcein im Wallac Victor Plattenlesegerät mit Fluorescein-Einstellungen gemessen. Die Zielzelllyse wurde relativ zu Kontrollen berechnet. Spontanfreisetzung (keine T-Zellen zu den Zielzellen gegeben) wurde als 0% Lyse, Maximallyse (0,5% Triton-X zu den Zielzellen gegeben) als 100% Lyse interpretiert.

4.3 Retroviraler TCR-Transfer

4.3.1 Herstellung von Retroviruspartikeln

Zur Herstellung von amphotropen Mausleukämievirus (MuLV)-pseudotypisierten Retroviren wurden die Expressionsplasmide für die Moloney-MLV *gag/pol*-Gene (pcDNA3.1MLVg/p) und das MuLV-10A1 *env*-Gen (pALF-10A1) zusammen mit (a) den die entsprechenden TCR-Ketten

enthaltenden retroviralen Vektoren MP71-TCR α und MP71-TCR β , oder (b) dem GFP-tragenden Vektor MP71Gpre (Transfektions- und Transduktionskontrolle) oder (c) ohne retroviralen Vektor (mock-Kontrolle) in 293T-Zellen eingebracht (Leisegang et al., 2008). Dazu wurden die 293T-Zellen mit Hilfe der Calciumphosphatpräzipitationsmethode transfiziert.

Hierzu wurden etwa 16 h vor der Transfektion die 293T-Zellen so auf einer 6-Well-Platte ausgesät (ca. 6×10^5 Zellen pro Well), dass die Zellen zur Transfektion eine Konfluenz von 60-70% aufwiesen. 30-60 min vor Transfektion wurde das DMEM-Standardmedium durch sogenanntes "Hungermedium" (DMEM-Medium mit nur 3% FKS) ersetzt. Als nächstes wurden für jedes zu transfizierende 6-Well 150 μ l einer CaCl₂-haltigen Plasmidlösung (15 μ l 2 M CaCl₂, 0,75 μ l 50 mM Chloroquin, je 4,5 μ g Plasmid-DNA der Vektoren MP71-TCR α und MP71-TCR β bzw. MP71Gpre sowie pcDNA3.1MLVg/p und pALF-10A1, mit H₂O ad 150 μ l aufgefüllt, sterilfiltriert) hergestellt.

Zur Präzipitatbildung wurden je zu transfizierendes 6-Well 150 μ l 2 \times HBSS (*Hank's buffered salt solution*)-Puffer (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 12 mM Glukose, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄ \times 2H₂O, pH 7,06, sterilfiltriert) in einem 13 ml Röhrchen vorgelegt und zum permanenten Durchmischen wurden durch Ausblasen einer 2 ml Pipette Luftblasen durch die Lösung geschickt. Währenddessen wurde nun die hergestellte Plasmidlösung langsam zugetropft. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung tröpfchenweise auf die 293T-Zellen gegeben und dabei die Zellkulturplatte leicht geschwenkt. Nach 6 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen auf der Platte einmal durch Abspülen mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml frischem DMEM-Standardmedium weiterkultiviert. Nach 2 Tagen wurde der retrovirushaltige Zellkulturüberstand geerntet, filtriert (0,45 μ m Porengröße) und sofort zur Transduktion von T-Zellen weiterverwendet.

4.3.2 Transduktion von T-Zellen

PBMCs (10^6 /Well in 1 ml) wurden 2 Tage vor der Transduktion mit 50 U/ml IL-2 und 50 ng/mL anti-CD3-Antikörper (OKT-3) in einer 24-Well-Platte aktiviert. Zur Transduktion wurden die aktivierten T-Zellen zur effizienteren Aufnahme von retroviralen Partikeln auf eine mit 5 μ g/Well RetroNectin vorbeschichtete 24-Well-Platte überführt. Es wurde 1 ml/Well des retrovirushaltigen Überstands zugegeben und die Zellen wurden in Anwesenheit von 4 μ g/ml Protaminsulfat und 100 U/ml IL-2 für 2 h bei $800 \times g$ und 32°C zentrifugiert. J76- und J76CD8-Zellen wurden ohne vorherige Aktivierung und ohne IL-2-Zugabe wie oben beschrieben transduziert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

4.3.3 Restimulation der TCR-transduzierten Zellen

Sechs Tage nach TCR-Transfer wurde die wöchentliche Restimulation von transduzierten PBMCs gestartet. Zur antigenspezifischen Stimulation wurden die transduzierten T-Zellen ($1,5 \times 10^6$ /Well in 1,5 ml) mit der bestrahlten (50 Gy) autologen pp65-exprimierenden mLCL im Effektor:Stimulator-Verhältnis von 4:1 in Anwesenheit von 100 U/ml IL-2 in 24-Well-Platten kokultiviert. Zur nicht-

spezifischen Stimulation wurden die transduzierten T-Zellen ($1,5 \times 10^6$ /Well in 1,5 ml) mit einer Mischung aus bestrahlten (50 Gy) allogenen PBMCs von drei verschiedenen Spendern ($1,5 \times 10^6$ /Well) sowie der bestrahlten (50 Gy) autologen pp65-negativen mLCL ($1,5 \times 10^5$ /Well) in Anwesenheit von 30 ng/ml OKT-3 und 100 U/ml IL-2 in einer 24-Well-Platte kokultiviert.

4.4 Infektion von Zellen mit HHV-6

Zur HHV-6-Propagierung

Zur Vermehrung der HHV-6-Virusstämme HST, Z29 (beide HHV-6B) und U1102 (HHV-6A) wurden zwei Zellarten getestet. Anfänglich fand die T-Zellleukämie-Zelllinie MOLT-3 Verwendung. In einer 24-Well Platte wurden 10^5 /Well MOLT-3-Zellen in 1 ml Medium mit 20 μ l/Well Z29-Viruslösung (1.400 Viren/ml) infiziert. Nachdem die Infektion sehr langsam voranschritt und die nicht infizierten MOLT-3-Zellen bereits nach 3 Tagen die infizierten Zellen innerhalb der Kultur überwuchsen, wurde für die weiteren Experimente aus Nabelschnurblutlymphozyten hergestellte PHA-Blasten verwendet. Nachdem die bei der amerikanischen Sammlung ATCC gekaufte Z29-Virussuspension eine sehr niedrige Viruskonzentration aufwies, wurden im Folgenden die bei der britischen "National Collection of Pathogenic Viruses" (NCPV) neu bestellten Virusstämme HST und U1102 (Konzentration vom Hersteller nicht angegeben) verwendet. Die aus Nabelschnurblut isolierten Lymphozyten (2×10^6 /Well in 2 ml) wurden 2-4 Tage vor Infektion mit 5 μ g/ml PHA in einer 24-Well-Platte aktiviert. Direkt vor der Infektion wurden die PHA-Blasten zweifach expandiert. Bei der ersten Passage der gekauften Virussuspensionen wurden jeweils 100 μ l/Well Virussuspension zu den PHA-Blasten pipettiert. Bei allen weiteren Passagen wurden jeweils 230 μ l/Well des vorher ebenfalls auf Nabelschnur-PHA-Blasten passagierten und bei -80°C gelagerten HST- bzw. U1102-haltigen Zellkulturüberstands zugegeben. Nach 5-7 Tagen, als der zytopathische Effekt am höchsten war, wurden die infizierten Zellkulturen geerntet, die Zellen abzentrifugiert und die virushaltigen Überstände aliquotiert und bei -80°C eingefroren oder sofort auf frischen PHA-Blasten weiterpassagiert.

Zur Herstellung von HHV-6-infizierten Zielzellen für die T-Zellanalyse

Zur Herstellung von HHV-6-infizierten Zellen als Zielzellen für die Analyse von HHV-6-spezifischen T-Zellen wurden unseparierte PBMCs oder vorher aus den PBMCs isolierte CD4^+ Zellen verwendet. Vier Tage vor der Infektion wurden die T-Zellen (2×10^6 /Well in 2 ml) in einer 24-Well-Platte mit 5 μ g/ml PHA aktiviert. Danach wurden die Zellen eingesammelt, gezählt und erneut in einer Konzentration von 2×10^6 /Well in 2 ml auf eine 24-Well-Platte verteilt. Die Zellen wurden mit jeweils 230 μ l/Well der vorher auf Nabelschnur-PHA-Blasten passagierten Virusbösungen infiziert. Nach weiteren 6 Tagen wurden die infizierten Zellen in Kokultivierungsexperimenten eingesetzt. Als Kontrolle wurden nicht infizierte PHA-Blasten verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Herstellung und Charakterisierung von CMV-spezifischen TCR-transgenen T-Zellen für die Immuntherapie

Die Reaktivierung von CMV bei immunsupprimierten Patienten nach einer Knochenmarkstransplantation führt zu lebensbedrohlichen Erkrankungen (Li et al., 1994). Zur Therapie solcher Komplikationen wurden in der Vergangenheit bereits erfolgreich CMV-spezifische T-Zellen des CMV-positiven Knochenmarkspenders verwendet (Cobbold et al., 2005; Einsele et al., 2002; Moss und Rickinson, 2005; Peggs et al., 2003; Riddell et al., 1992). Patienten mit einem CMV-negativen Knochenmarkspender haben ein erhöhtes Risiko, jedoch fehlt eine Möglichkeit zur adoptiven T-Zelltherapie bisher, weil CMV-spezifische T-Zellen von solchen Spendern nicht herstellbar sind. Um dieses Problem zu lösen, sollte der CMV-spezifische T-Zellrezeptor von CMV-spezifischen T-Zellklonen, hergestellt von einem CMV-positiven Spender, mittels retroviralem Transfer auf T-Zellen des CMV-negativen Knochenmarkspenders übertragen werden. Die resultierenden CMV-spezifischen, TCR-transgenen T-Zellen sollen so in der Zukunft zur adoptiven Therapie von CMV-Komplikationen nach der Knochenmarkstransplantation verwendet werden können.

5.1.1 Generierung von CMV-spezifischen T-Zellklonen

Für die Herstellung CMV-spezifischer T-Zellklone wurden verschiedene, in unserem Labor bereits etablierte Stimulationsverfahren verwendet. Generell werden dabei die im Blut von CMV-seropositiven Spendern enthaltenen CMV-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen durch antigenspezifische Stimulation angereichert. Um sehr schnell T-Zellen spezifisch für ein bereits bekanntes CMV-Epitop anzureichern, werden primäre T-Zellen von CMV-positiven Spendern durch mit dem entsprechenden CMV-Peptid beladene autologe CD40-aktivierte B-Zellen stimuliert (Wiesner et al., 2008). Alternativ können CMV-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch Stimulation mit autologen mini-EBV-transformierten B-Zellen, die zusätzlich die CMV-Antigene pp65 oder IE-1 exprimieren (pp65-mLCL bzw. IE-1-mLCL), angereichert werden (Moosmann et al., 2002; Wiesner et al., 2005). Dabei können theoretisch T-Zellen gegen alle zum HLA-Typ des Spenders passenden CMV-Epitope vermehrt und so auch T-Zellen gegen vorher noch nicht beschriebene Epitope hergestellt werden. Durch anschließende Einzelzellklonierung der polyklonalen T-Zelllinien werden CMV-spezifische T-Zellklone hergestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden CMV-spezifische T-Zellklone gegen die pp65-Epitope YSE (HLA-A*0101), NLV (HLA-A*0201) und IPS (HLA-B*3501) sowie die IE-1-Epitope VLE (HLA-A*0201) und QIK (HLA-B*0801) etabliert. Die NLV- und IPS-spezifischen T-Zellen wurden mittels Peptidstimulation angereichert, wie in Abbildung 5-1A exemplarisch für die NLV-spezifischen T-Zellen des Spenders JG gezeigt ist. Die YSE-, VLE- und QIK-spezifischen T-Zellen wurden bei

der Stimulation mit der autologen pp65- bzw. IE-1-exprimierenden mLCL angereichert, was am Beispiel der YSE-spezifischen T-Zellen von Spender MD gezeigt ist (Abbildung 5-1B). Durch limitierende Verdünnung der CMV-spezifischen polyklonalen T-Zelllinien habe ich die Zellen vereinzelt und so CMV-spezifische T-Zellklone hergestellt.

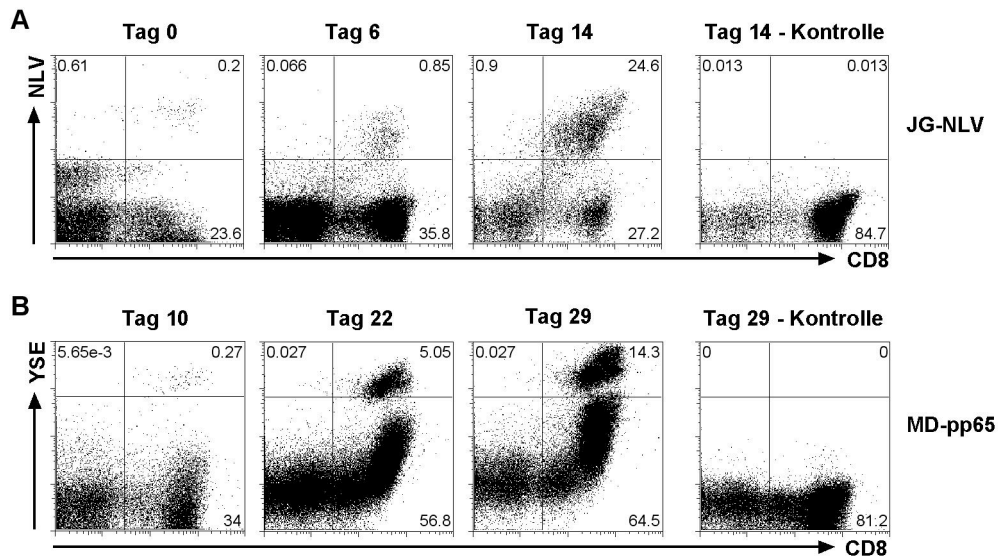


Abbildung 5-1: Anreicherung von CMV-spezifischen T-Zellen durch antigenspezifische Stimulation. (A) Die Häufigkeit von CD8⁺ CMV-spezifischen T-Zellen, die das HLA-A*0201-restringierte pp65-Epitop NLV erkennen, wurde an Tag 0, Tag 6 und Tag 14 nach anfänglicher Stimulation von PBMCs des Spenders JG mit NLV-Peptid durch Färbung mit NLV-Tetramer und anti-CD8-Antikörper bestimmt. Zur Kontrolle wurde die Färbeprozedur ohne Zugabe von NLV-Tetramer durchgeführt. (B) Die Häufigkeit von CD8⁺ CMV-spezifischen T-Zellen, die das HLA-A*0101-restringierte pp65-Epitop YSE erkennen, wurde an Tag 10, Tag 22 und Tag 29 während wiederholter Stimulation von PBMCs des Spenders MD mit der autologen pp65-exprimierenden mLCL durch Färbung mit YSE-Pentamer und anti-CD8-Antikörper bestimmt. Zur Kontrolle wurde die Färbeprozedur ohne Zugabe von YSE-Pentamer durchgeführt.

Nun wurde die spezifische Reaktivität der erhaltenen Klone gegenüber mLCLs, die das CMV-Antigen pp65 bzw. IE-1 exprimieren, und Kontroll-mLCLs bzw. CMV-antigenfreien CD40-aktivierten B-Zellen (BBL) getestet. Als Beispiel ist der Test der T-Zellklone gezeigt, die durch Klonierung der NLV-peptidstimulierten T-Zelllinie des Spenders RZ (Abbildung 5-2A) bzw. der IE-1-mLCL-stimulierten Linie des Spenders F61 (Abbildung 5-2B) erhalten wurden. Zur weiteren, detaillierten Charakterisierung wurden T-Zellklone ausgewählt, die stark und ausschließlich die CMV-antigenpräsentierende mLCL erkannten, wie hier beispielsweise der pp65-reaktive Klon RZ-20 (Abbildung 5-2A) und die Klone F61-7, F61-35, F61-38 und F61-53 (Abbildung 5-2B).

Bei der Stimulation der primären T-Zellen des Spenders MD mit der autologen pp65-mLCL kam es neben der erwartungsgemäßen Anreicherung von YSE-spezifischen T-Zellen auch zur Vermehrung von pp65-spezifischen T-Zellen mit anderen HLA-Restriktionen (MD-21 und MD-25P). Diese neuen Epitopspezifitäten konnten nach Einzelzellklonierung der T-Zelllinie als monoklonale T-Zelllinien weiter untersucht werden (siehe Abschnitt 5.1.2).

Zwei weitere, im Rahmen dieser Arbeit untersuchte pp65-spezifische T-Zellklone (F36-30, CD8-Klon, NLV-spezifisch und F46-17, CD4-Klon, RPHE-spezifisch), wurden bereits in Vorarbeiten von Andreas Moosmann durch Stimulation mit der autologen pp65-exprimierenden mLCL hergestellt.

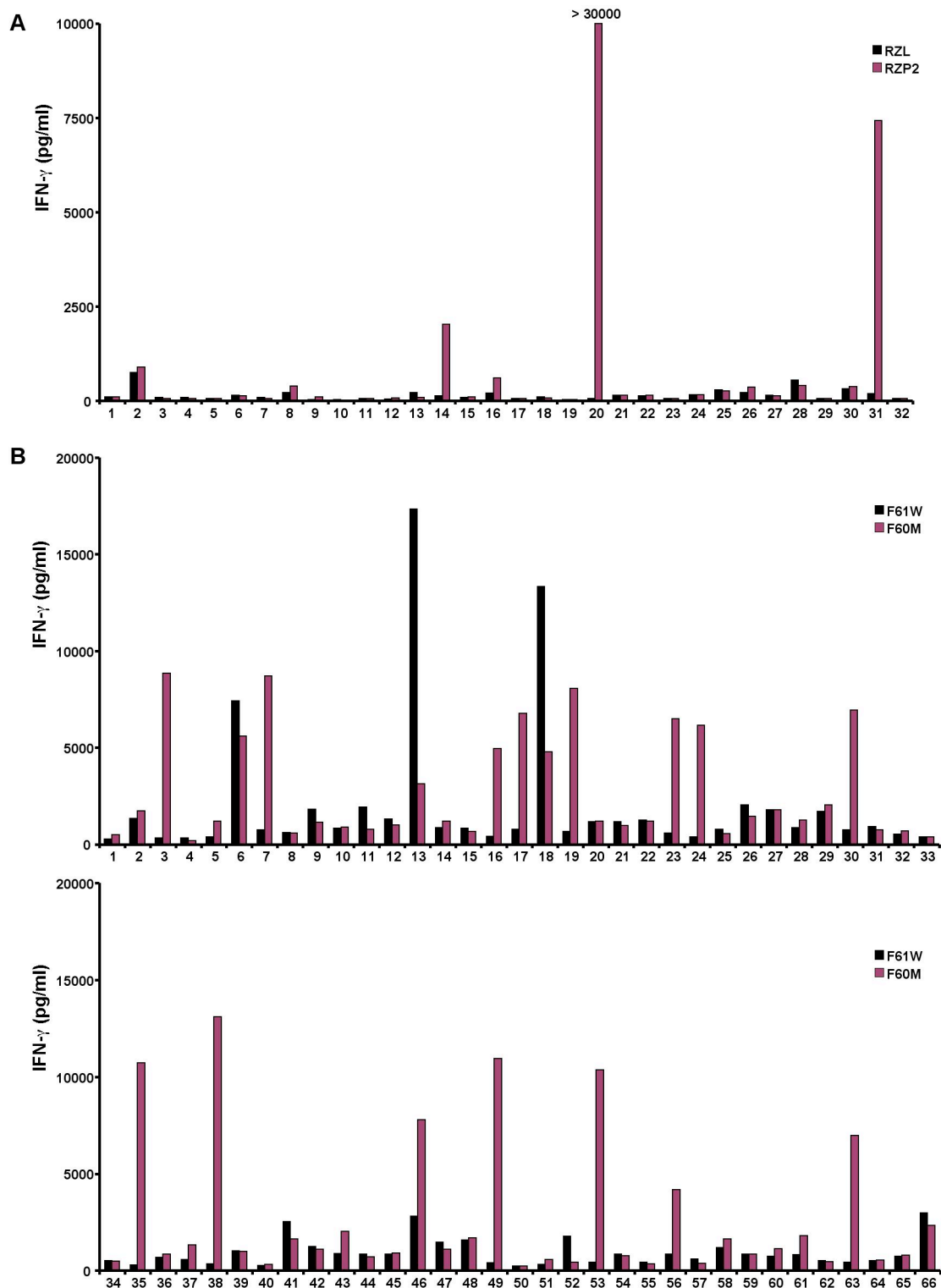


Abbildung 5-2: Reaktivitätsanalyse der neu hergestellten T-Zellklone. (A) Die CMV-spezifische Reaktivität der T-Zellklone, die durch anfängliche Stimulation von PBMCs des Spenders RZ mit autologen NLV-peptidbeladenen CD40-aktivierten B-Zellen (BBL) und limitierende Verdünnung nach 16 Tagen generiert worden waren, wurde durch Kokultur mit autologen pp65-mLCLs (RZP2) sowie CMV-antigenfreien BBL (RZL) und anschließend IFN- γ -ELISA bestimmt. (B) Die CMV-spezifische Reaktivität der T-Zellklone, die durch wiederholte Stimulation von PBMCs des Spenders F61 mit der autologen IE-1-mLCL (F61M) und limitierende Verdünnung nach 23 Tagen generiert worden waren, wurde durch Kokultur mit allogenen HLA-A2-positiven IE-1-mLCLs (F60M) (da die autologe Linie nicht verfügbar war) sowie durch Kokultur mit der autologen CMV-antigenfreien mLCL (F61W) und anschließend IFN- γ -ELISA bestimmt.

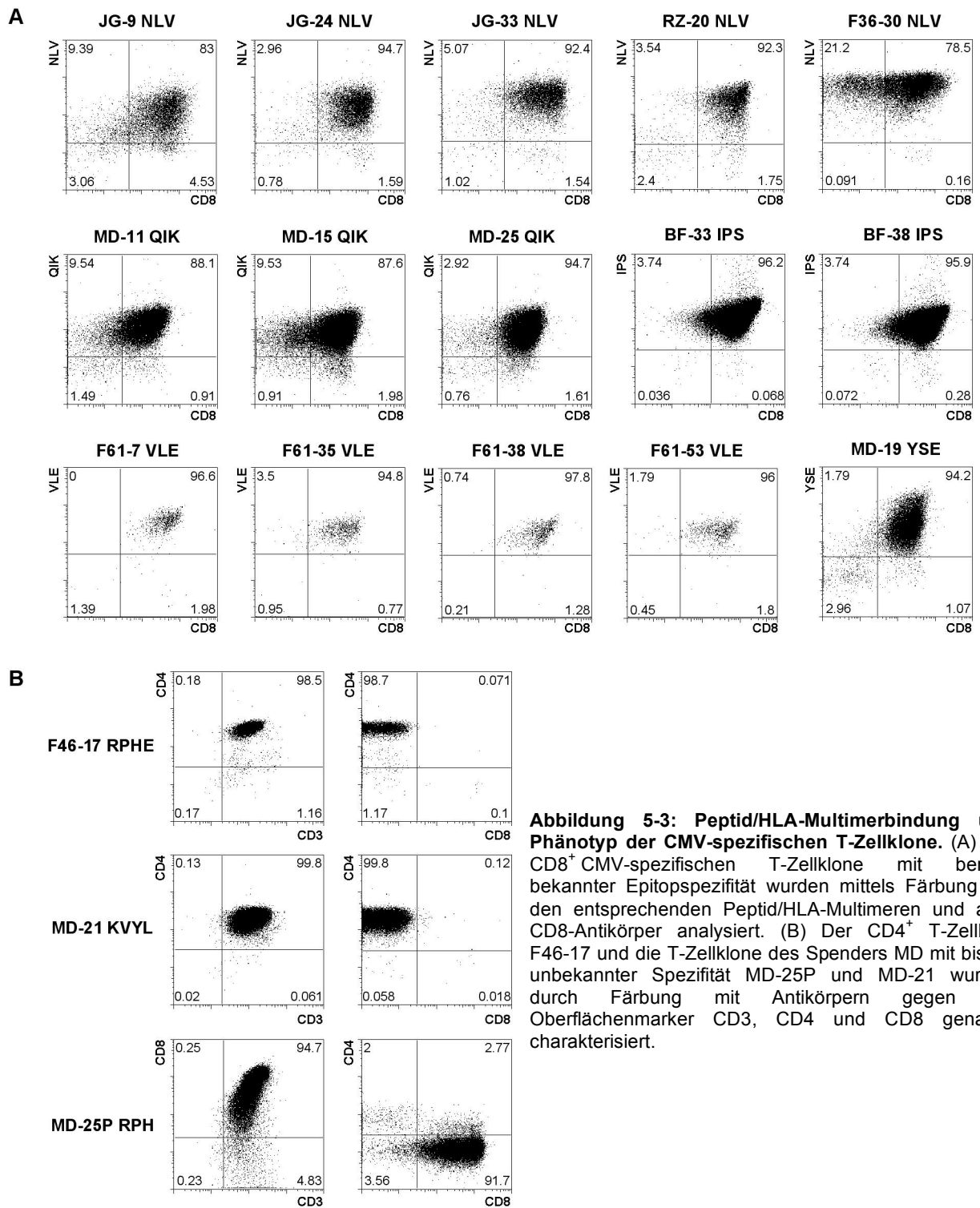
5.1.2 Charakterisierung der Reaktivität und Spezifität der hergestellten pp65- und IE-1-spezifischen T-Zellklone

Die im folgenden Teil meiner Arbeit analysierten T-Zellklone sind in der Tabelle 5-I zusammengestellt.

Tabelle 5-I: Überblick über die zur Analyse verwendeten CMV-spezifischen T-Zellklone

Spender	Klon	Typ	Spezifität	HLA-Restriktion	Art der Herstellung
pp65-spezifisch					
JG	JG-9	CD8	NLV	A*0201	Peptidstimulation
JG	JG-24	CD8	NLV	A*0201	Peptidstimulation
JG	JG-33	CD8	NLV	A*0201	Peptidstimulation
RZ	RZ-20	CD8	NLV	A*0201	Peptidstimulation
F36	F36-30	CD8	NLV	A*0201	mLCL-Stimulation
BF	BF-33	CD8	IPS	B*3501	Peptidstimulation
BF	BF-38	CD8	IPS	B*3501	Peptidstimulation
MD	MD-19	CD8	YSE	A*0101	mLCL-Stimulation
MD	MD-25P	CD8	unbekannt	unbekannt	mLCL-Stimulation
MD	MD-21	CD4	unbekannt	unbekannt	mLCL-Stimulation
F46	F46-17	CD4	RPHE	DR13 bzw. DQ6	mLCL-Stimulation
IE-1-spezifisch					
F61	F61-7	CD8	VLE	A*0201	mLCL-Stimulation
F61	F61-35	CD8	VLE	A*0201	mLCL-Stimulation
F61	F61-38	CD8	VLE	A*0201	mLCL-Stimulation
F61	F61-53	CD8	VLE	A*0201	mLCL-Stimulation
MD	MD-11	CD8	QIK	B*0801	mLCL-Stimulation
MD	MD-15	CD8	QIK	B*0801	mLCL-Stimulation
MD	MD-25	CD8	QIK	B*0801	mLCL-Stimulation

Als erstes habe ich durch Peptid/HLA-Multimerfärbung die Antigenbindung der verwendeten CMV-spezifischen T-Zelllinien verifiziert (Abbildung 5-3). Die untersuchten T-Zelllinien enthielten dabei T-Zellen, die sich durch ein einheitliches Färbeverhalten auszeichneten, was für monoklonale T-Zellen typisch ist. Die NLV-, QIK-, IPS-, VLE- und YSE-spezifischen T-Zellklone zeigten eine deutliche Bindung an das entsprechende Peptid/HLA-Multimer (Abbildung 5-3A). Bei den pp65-reaktiven T-Zellklonen MD-25P und MD21 des Spenders MD handelte es sich um einen CD8⁺ und einen CD4⁺ T-Zellklon (Abbildung 5-3B). Auch der RPHE-spezifische T-Zellklon F46-17 konnte als CD4⁺ T-Zelllinie bestätigt werden.



Nun habe ich die **Reaktivität der hergestellten CMV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellklone** gegenüber autologen und allogenen B-Zellen, die das entsprechende CMV-Antigen endogen prozessieren und präsentieren, sowie zur Kontrolle gegenüber CMV-antigenfreien B-Zelllinien verschiedener Spender untersucht. Alle getesteten pp65- und IE-1-spezifischen T-Zellklone erkannten ausschließlich die autologen sowie die im HLA-Typ passenden allogenen mLCLs (Abbildung 5-4). Die LCLs bzw. mLCLs ohne das entsprechende CMV-Antigen und die nicht zur HLA-Restriktion des T-Zellklons passenden B-Zellen wurden nicht erkannt. Auch der RPHE-spezifische CD4⁺ T-Zellklon schüttete nach Erkennung der HLA-DR13+/HLA-DQ6+

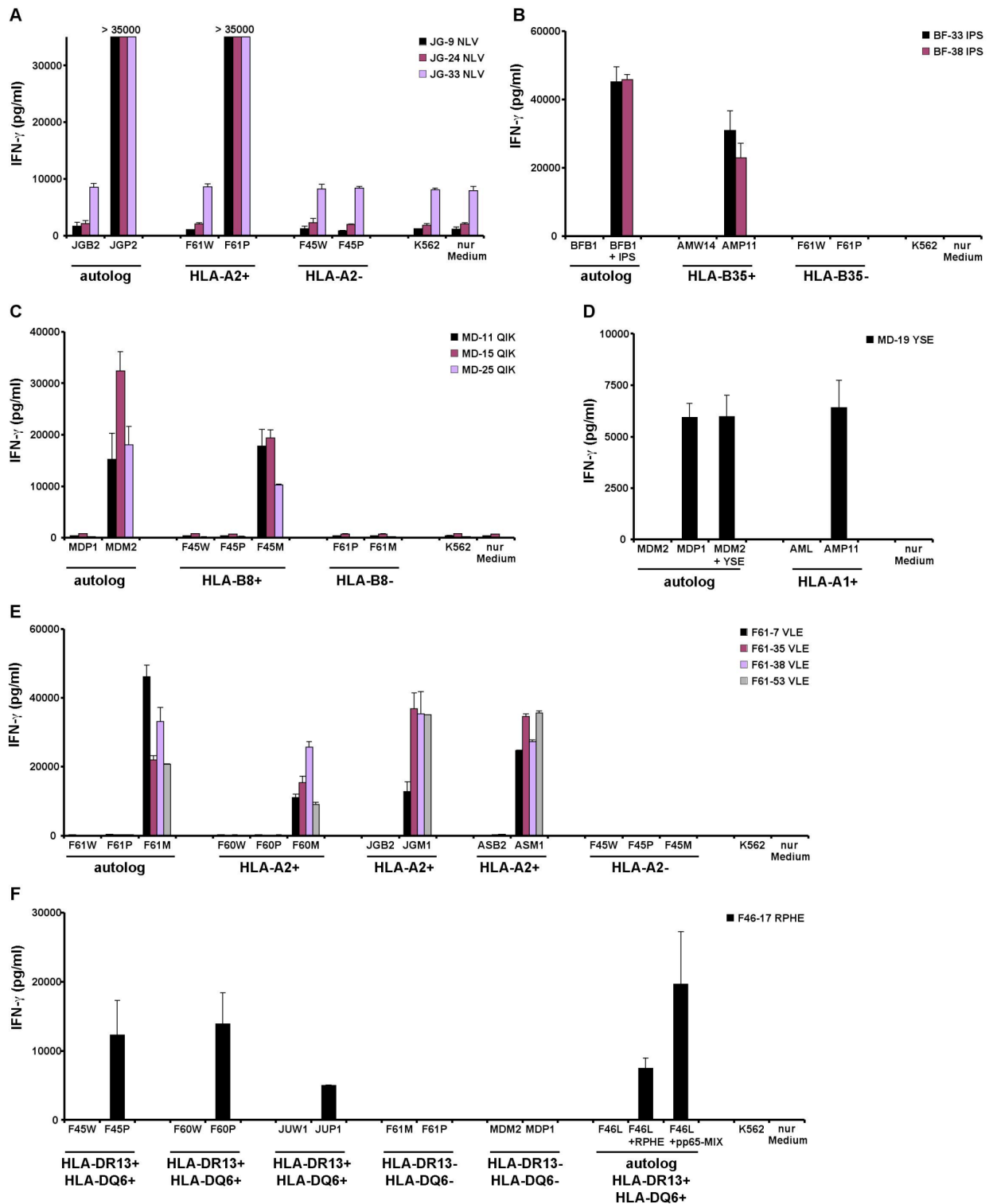


Abbildung 5-4: Antagenspezifische IFN- γ -Ausschüttung der CMV-spezifischen T-Zellklone nach Erkennung von endogen prozessiertem Antigen. Die Erkennung von endogen prozessiertem CMV-Antigen durch die (A) NLV-, (B) IPS-, (C) QIK-, (D) YSE-, (E) VLE- und (F) RPHE-spezifischen T-Zellklone wurde mittels IFN- γ -ELISA analysiert. Dazu wurden die T-Zellen mit autologen und allogenen B-Zellen, die das entsprechende CMV-Antigen exprimieren, und als Kontrolle mit autologen und allogenen CMV-antigenfreien B-Zellen kokultiviert (W: Kontroll-mLCL; P: pp65-mLCL; M: IE-1-mLCL; L: BBLs). In einzelnen Fällen wurden die Zielzellen zusätzlich exogen mit dem jeweiligen Peptidepitop oder einer Mischung aus pp65-Peptiden (pp65-MIX) beladen. Durch die Auswahl von allogenen Zielzellen unterschiedlichen HLA-Typs wurde die HLA-Restriktion der Erkennung überprüft. Es sind die Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikaten gezeigt.

pp65-exprimierenden mLCL sowie der RPHE-peptidbeladenen autologen BBL (Abbildung 5-4F) spezifisch IFN- γ aus. Nachdem die HLA-Allele DR13 und DQ6 kovererbt werden, waren keine

Zielzellen verfügbar, die nur für eines der beiden HLA-Allele positiv sind. Deshalb konnte bisher nicht eindeutig gezeigt werden, auf welchem von beiden HLA-Molekülen das RPHE-Peptid dem T-Zellklon präsentiert wird.

Der pp65-spezifische **CD8⁺ Klon MD-25P** zeigte keine Reaktivität gegenüber den zum HLA-Typ des Spenders MD passenden bekannten Epitopen YSE (HLA-A1), GPI und ATV (beide HLA-A11) (Daten nicht gezeigt). Ebenso war das der pp65-Erkennung des CD4⁺ T-Zellklons MD-21 zu Grunde liegende Epitop nicht bekannt. Um die Epitopspezifität dieser T-Zellklone zu bestimmen, wurde eine überlappende Peptidbank verwendet, die die gesamte Sequenz von pp65 abdeckt (Kern et al., 2002). Jedes einzelne Peptid dieser Bank ist 15 Aminosäuren lang und die einzelnen Peptide überlappen um 11 Aminosäuren. Diese Wahl des Überlappungsbereiches und die Länge der Peptide bedeutet, dass jede mögliche pp65-Sequenz von bis zu 12 Aminosäuren in der Peptidbank enthalten ist. Da CD8-Epitope in der Regel 8-11 Aminosäuren lang sind, sollte eine Identifizierung aller CD8-Epitope (Kern et al., 2000; Maecker et al., 2001) und der meisten CD4-Epitope (Maecker et al., 2001) möglich sein. Die 138 Peptide wurden in einer zweidimensionalen Matrix in zweimal 12 Gruppen angeordnet, was die Identifizierung der T-Zellepitope in 24 Einzelreaktionen erlaubt (Abbildung 5-5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
14	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
15	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
16	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
17	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
18	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
19	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
20	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
21	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
22	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
23	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
24	133	134	135	136	137	138						

Abbildung 5-5: Zusammensetzung der Peptidgruppen der pp65-Peptidbank zur Identifizierung neuer T-Zell-epitope. 138 jeweils 15 Aminosäuren lange Peptide, die sich um jeweils 11 Aminosäuren überlappen und zusammen die gesamte Sequenz von pp65 abdecken, wurden in 24 Gruppen gemischt.

Der CD8⁺ T-Zellklon MD-25P zeigte eine spezifische Reaktion auf die Peptidgruppen 6, 7 und 18 (Abbildung 5-6A). Somit sollte das gesuchte pp65-Epitop im Überlappungsbereich der Peptide 66 und 67 liegen, welcher die Sequenz RPHERNGFTVL hat. Das 11-mer RPHERNGFTVL wurde bereits von Longmate und Kollegen (Longmate et al., 2001) als HLA-B*0702-restringiert beschrieben. Der Spender MD ist allerdings HLA-B*0702-negativ. Die Erkennung dieses Epitops muss also durch ein anderes HLA-Klasse-I-Molekül vermittelt werden. Um dazu genauere Aussagen machen zu können, wurde die CMV-spezifische Reaktivität des T-Zellklons gegenüber

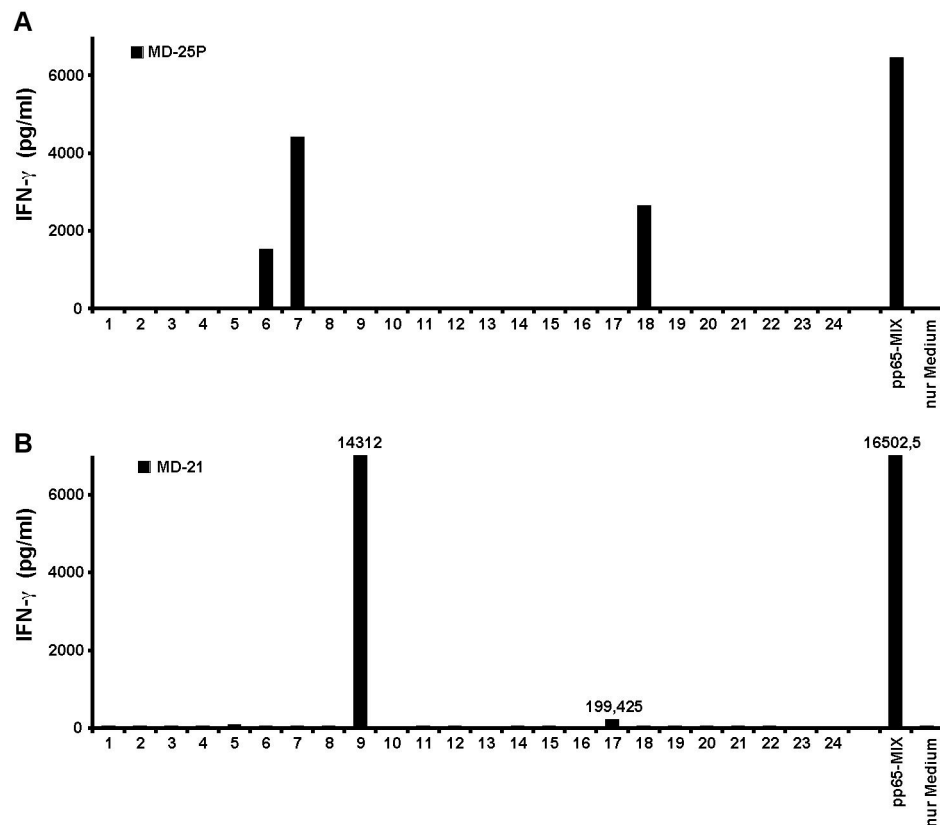


Abbildung 5-6: Identifizierung der pp65-Epitope, die von den T-Zellklonen MD-25P (A) und MD-21 (B) erkannt werden. Die T-Zellklone wurden mit den 24 Subgruppen der pp65-Peptidbank (Abbildung 5-5) beladen. Die spezifische Ausschüttung von IFN- γ wurde nach über-Nacht-Inkubation mittels IFN- γ -ELISA quantifiziert.

pp65-mLCLs von verschiedenen Spendern mit unterschiedlichem HLA-Hintergrund (siehe Tabelle 3-I, Seite 21) überprüft (Abbildung 5-7, A und B). Von fünf allogenen mLCLs, die entweder das pp65-Protein exprimierten oder mit dem pp65-Peptid-10-mer RPH beladen waren, wurde keine erkannt. Nur die autologe pp65-mLCL sowie RPH-peptidbeladene B-Zellen wurden erkannt. Theoretisch könnten alle auf Zellen des Spenders MD exprimierten HLA-Klasse-I-Moleküle, nämlich A*01, A*11, B*08, B*1501, C*03 und C*0701, für die Präsentation des RPH-Peptids in Frage kommen. Nachdem allerdings die pp65-mLCLs der Spender F45 (A*01, B*08, C*0701), F37 (B*1505, C*0702), F14 (A*01, B*62, C*03) und F60 (C*0702) nicht durch den T-Zellklon erkannt wurden, kann die HLA-Restriktion auf A*11 oder B*1501 (und zwar nur dieser HLA-B15-Subtyp) eingeschränkt werden. Ein Fehler bei der HLA-Typisierung des Spenders MD und eine HLA-B*0702-restringierte Erkennung des RPH-Peptids, im Einklang mit der publizierten Epitoprestriktion (Longmate et al., 2001), kann ausgeschlossen werden, da die vom T-Zellklon nicht erkannten pp65-mLCLs der Spender F37 und F60 HLA-B7-positiv waren. Aufgrund der Peptidsequenz ist die Bindung an das HLA-A*11-Molekül relativ unwahrscheinlich, weil A*11-präsentierte Peptide fast immer ein Lysin (K) in der C-terminalen Position enthalten. Auch eine Bindung an das HLA-B*1501-Molekül halte ich nicht für besonders wahrscheinlich, da B*1501-präsentierte Peptide meistens ein Tyrosin (Y) am C-Terminus tragen. Nachdem schon in früheren Experimenten Unregelmäßigkeiten bei der Erkennung der pp65-mLCL des Spenders F45 (F45P) beobachtet wurden, d.h. die F45P-mLCL als einzige HLA-A1- und pp65-positive Zelllinie von YSE-

spezifischen T-Zellen nicht erkannt wurde (Daten nicht gezeigt), ist ein Defekt bei der pp65-Antigenexpression in dieser mLCL nicht auszuschließen. Sollte dies der Fall sein, bliebe auch noch eine Restriktion des RPH-Peptids über HLA-C*0701 denkbar. Um Klarheit über die HLA-Restriktion der RPH-Erkennung durch den Klon MD-25P zu erhalten, müssen jedoch noch weitere pp65-mLCLs oder RPH-peptidbeladene Zellen von HLA-C*0701- sowie von HLA-A*11- bzw. HLA-B*1501-positiven Spendern getestet werden. Außerdem habe ich die Erkennung von autologen pp65-freien mLCLs überprüft, die mit den überlappenden Peptiden RPHERNGFTVL (11-mer) und HERNGFTVLC (10-mer), welches als HLA-B40-restringiertes CD8-Epitop beschrieben wurde (Kondo et al., 2004), beladenen worden waren (Abbildung 5-7B). Es werden nur die RPH-beladenen Zellen erkannt.

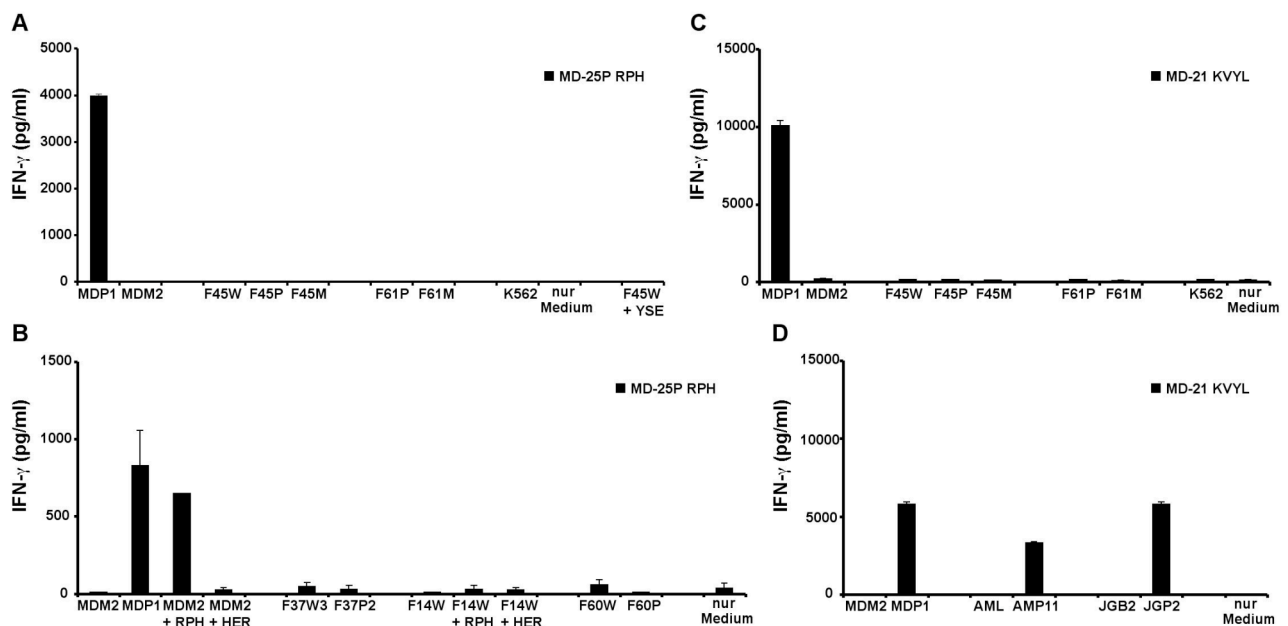


Abbildung 5-7: Charakterisierung der pp65-Reaktivität der T-Zellklone MD-25P (A, B) und MD-21 (C, D). Die Erkennung von endogen prozessiertem pp65 sowie von pp65-Peptiden durch die T-Zellklone wurde mittels IFN- γ -ELISA analysiert. Dazu wurden die T-Zellen mit autologen und allogenen B-Zellen, die pp65 exprimieren oder vorher mit pp65-Peptid beladen worden waren, und als Kontrolle mit autologen und allogenen CMV-antigenfreien B-Zellen kokultiviert. Durch die Auswahl von allogenen Zielzellen unterschiedlichen HLA-Typs wurde die HLA-Restriktion der Erkennung überprüft. Die HLA-Typen der B-Zellspender finden sich in Tabelle 3-I. Es sind die Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikaten gezeigt.

Der **CD4⁺ T-Zellklon MD-21** reagiert gegenüber den Peptidgruppen 9 und 17 (Abbildung 5-6B). Das Peptid 57 ist als einziges Peptid in beiden Peptidgruppen enthalten und hat die Sequenz KVYLESFCEDVPSGK. Das 15-mer KVYL wurde von Li Pira und Kollegen (Li Pira et al., 2004) als HLA-DRB1-15-restringiert beschrieben. Nachdem der Spender MD allerdings HLA-DRB1-15-negativ ist, muss das Peptid KVYL hier über ein anderes HLA-Klasse-II-Molekül präsentiert werden. Der Spender MD besitzt die HLA-II-Allele DRB1-03, DRB1-11, DQB1-02 und DQB1-03. Über die HLA-DP-Allele von MD ist leider nichts bekannt. Um die HLA-Restriktion des KVYL-spezifischen T-Zellklons genauer zu charakterisieren, wurde die Erkennung von pp65-mLCLs verschiedener Spender, die in unterschiedlichen HLA-Allelen mit Spender MD überlappen (HLA-Typen siehe Tabelle 3-I, Seite 21), untersucht (Abbildung 5-7, C und D). Der T-Zellklon reagierte

nur auf die autologe pp65-mLCL und die pp65-positiven B-Zellen der Spender AM und JG. Die pp65-exprimierenden mLCLs der Spender F45 und F61 hingegen wurden nicht erkannt. MD, AM und JG haben die HLA-Moleküle DRB1-11 und DQB1-03 gemeinsam. Eine DQB1-03-restringierte Erkennung von pp65 ist allerdings unwahrscheinlich, weil der T-Zellklon gegenüber der pp65-mLCL des ebenfalls DQB1-03-positiven Spenders F45 nicht reagierte. Sollte sich der oben beschriebene Verdacht eines Defekts in der pp65-Expression der F45P-mLCL als richtig erweisen, ist auch noch eine DQB1-03-Restriktion denkbar. Es könnte damit die HLA-Restriktion des KVYL-spezifischen T-Zellklons durch HLA-DRB1-11 (auch DR11), eventuell auch DQB1-03 bzw. ein HLA-DP-Allel plausibel gemacht werden. Um die Restriktion über ein HLA-DP-Allel auszuschließen, wird die Typisierung der HLA-DP-Allele der Spender MD, AM und JG notwendig sein. Zur Klärung der möglichen HLA-DQB1-03-Restriktion muss die pp65-Expression in der F45P-mLCL überprüft sowie eine ausführlichere Analyse der Reaktivität gegenüber HLA-DQB1-03-positiven pp65-mLCLs durchgeführt werden.

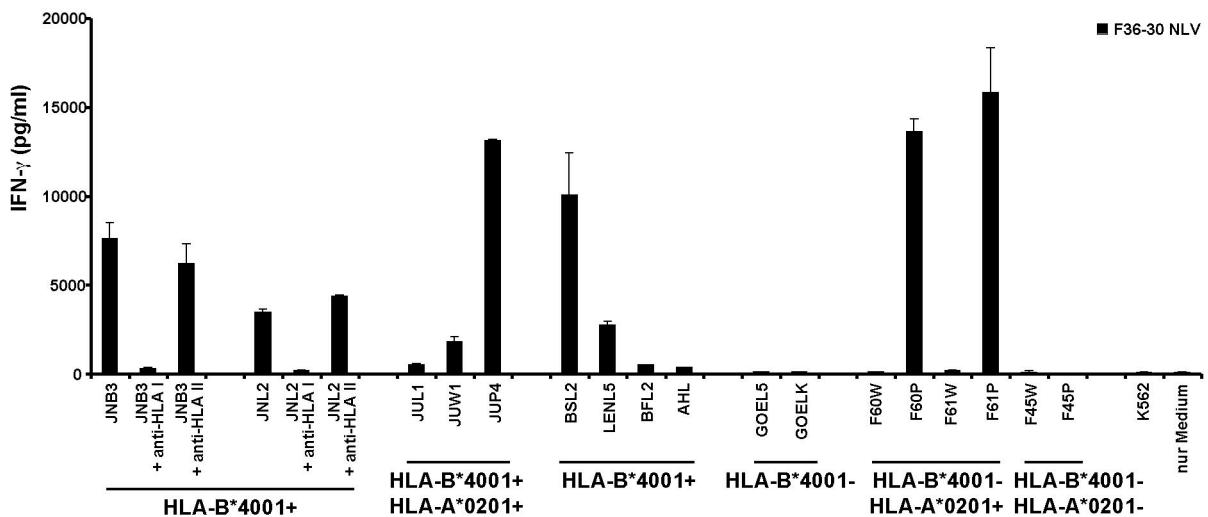


Abbildung 5-8: pp65- und HLA-B*4001-spezifische Ausschüttung von IFN-γ durch den NLV-spezifischen T-Zellklon F36-30. Die Erkennung von endogen prozessiertem pp65 sowie die pp65-unabhängige Kreuzreaktivität des NLV-spezifischen T-Zellklons des Spenders F36 (HLA-A*0201+, HLA-B*4001-) wurde mittels IFN-γ-ELISA analysiert. Dazu wurden die T-Zellen mit HLA-A2-positiven pp65-mLCLs und mit CMV-antigenfreien B-Zellen verschiedener Spender kokultiviert. Durch die Auswahl von allogenen Zielzellen unterschiedlichen HLA-Typs wurde die HLA-Restriktion der Reaktivität überprüft. Es sind die Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikaten gezeigt.

Bei der Untersuchung der Erkennung von endogen prozessiertem pp65 auf allogenen mLCLs durch den **NLV-spezifischen T-Zellklon F36-30** wurde eine pp65-spezifische Reaktivität des Klons gegenüber den HLA-A2-positiven Zellen der Spender F60, F61 und JU sowie eine **zusätzliche nicht CMV-spezifische Reaktivität** des Klons gegenüber mehreren als Kontrolle eingesetzten CMV-freien B-Zellen festgestellt (Abbildung 5-8). Es wurden nämlich auch die pp65-negativen mLCLs bzw. LCLs und BBL der Spender JN, JU, BS, LEN, BF und AH durch den T-Zellklon F36-30 erkannt. Alle diese Spender haben das HLA-B*4001-Allel gemeinsam. Die Spender F60, F61, F45 und GOE, deren pp65-negative B-Zellen nicht erkannt wurden, sind HLA-B*4001-negativ. Die pp65-unabhängige Erkennung von B-Zellen – und zwar sowohl von LCLs (JNB3) als auch von EBV-freien CD40-aktivierten B-Zellen (JNL2) – des HLA-B40-positiven

Spenders JN konnte durch die Zugabe des HLA-I-blockierenden Antikörpers, jedoch nicht durch die Zugabe des HLA-II-blockierenden Antikörpers, inhibiert werden. Dieser NLV-spezifische T-Zellklon ist also kreuzreaktiv gegenüber einem bisher nicht genauer definierten Autoantigen, das auf HLA-B*4001-Molekülen präsentiert werden kann. Die Reaktivität des T-Zellklons gegenüber den HLA-B40-positiven Zellen war unterschiedlich stark, was durch eine unterschiedliche Expression des Autoantigens in den Zielzellen oder eine unterschiedlich effiziente Antigenpräsentation (Oberflächenexpression des HLA-Moleküls, kostimulatorische Moleküle) erklärt werden kann. Durch die Kreuzreaktivität des T-Zellklons kam es in jedem Fall zu einer schwächeren IFN- γ -Sekretion als durch die pp65-spezifische Aktivierung der T-Zellen. Die NLV-spezifische wie auch die HLA-B*4001-spezifische Erkennung der B-Zellen führte darüber hinaus nicht nur zur Ausschüttung des Effektorzytokins IFN- γ (Abbildung 5-8), sondern auch zur spezifischen Lyse der antigentragenden Zellen (Abbildung 5-9) durch den T-Zellklon F36-30.

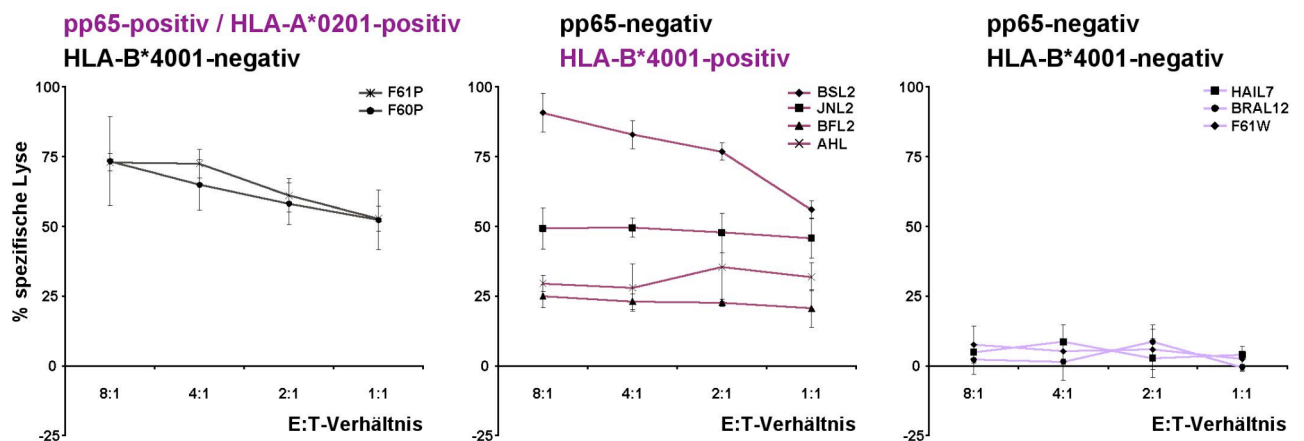


Abbildung 5-9: pp65- und HLA-B40-spezifische Zytotoxizität des NLV-spezifischen T-Zellklons F36-30. Die spezifische Lyse von pp65- sowie von HLA-B40-positiven Zielzellen durch den NLV-spezifischen T-Zellklon des Spenders F36 (HLA-A2+, HLA-B40-) wurde mittels Calcein-Freisetzungstest analysiert. Dazu wurden die T-Zellen mit Calcein-gefärbten HLA-A2-positiven pp65-mLCLs, sowie mit CMV-antigenfreien HLA-B40-positiven B-Zellen und als Kontrolle mit pp65- und HLA-B40-negativen B-Zellen kokultiviert. Das nach 4 h freigesetzte Calcein wurde fluorometrisch quantifiziert. Die durch den T-Zellklon hervorgerufene Calceinfreisetzung wurde nach der Formel: (spezifische Lyse – Spontanlyse)/(Maximallyse – Spontanlyse) berechnet. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten gezeigt.

Um zu überprüfen, ob sich die B*4001-spezifische Reaktivität gegen ein universell oder nur in B-Zellen exprimiertes Autoantigen richtet, müssen in Zukunft andere HLA-B*4001-positive Zelltypen als Zielzellen getestet werden. Außerdem wäre es interessant die Häufigkeit der HLA-B*4001-kreuzreaktiven Zellen innerhalb der pp65-spezifischen T-Zellpopulation von HLA-A*0201-positiven/HLA-B*4001-negativen Spendern zu quantifizieren.

Um einen Eindruck der **Avidität der CMV-spezifischen T-Zellklone** gegenüber ihrem Antigen zu erhalten, habe ich eine Titration des jeweiligen CMV-Peptids auf antigenpräsentierenden B-Zellen mit anschließender Kokultur mit dem entsprechenden T-Zellklon durchgeführt (Abbildung 5-10). Dabei habe ich festgestellt, dass die T-Zellklone unterschiedliche Aviditäten gegenüber ihrem auf B-Zellen präsentierten Epitop haben. Von den relativ hochaviden VLE-spezifischen T-Zellklonen wurde das VLE-Peptid ab einer Konzentration von 10^{-10} M erkannt (Abbildung 5-10F), von den relativ niedrigaviden QIK-spezifischen T-Zellklonen das QIK-Peptid erst ab einer Konzentration von

10^{-6} M (Abbildung 5-10E). Nachdem alle diese T-Zellklone durch Stimulation mit der autologen IE-1-mLCL hergestellt wurden, ist auszuschließen, dass bei der Herstellung der T-Zellklone durch die unterschiedlichen Stimulationsverfahren (Peptidstimulation bzw. Stimulation mit endogen prozessiertem Antigen) eine verfahrensabhängige Selektion bezüglich der T-Zellavidität stattgefunden hat. Die NLV-spezifischen T-Zellklone der Spender JG und F36, die, wie sich in späteren Untersuchungen zeigte, einen unterschiedlichen TCR tragen (Tabelle 5-II), zeigen dennoch eine in etwa gleiche Avidität gegenüber dem von B-Zellen präsentierten NLV-Peptid (Abbildung 5-10, A und B). Auch die VLE-spezifischen T-Zellklone des Spenders F61, die sich ebenfalls in der TCR-Verwendung unterscheiden (Tabelle 5-II), zeigen eine untereinander vergleichbare funktionelle Avidität (Abbildung 5-10F).

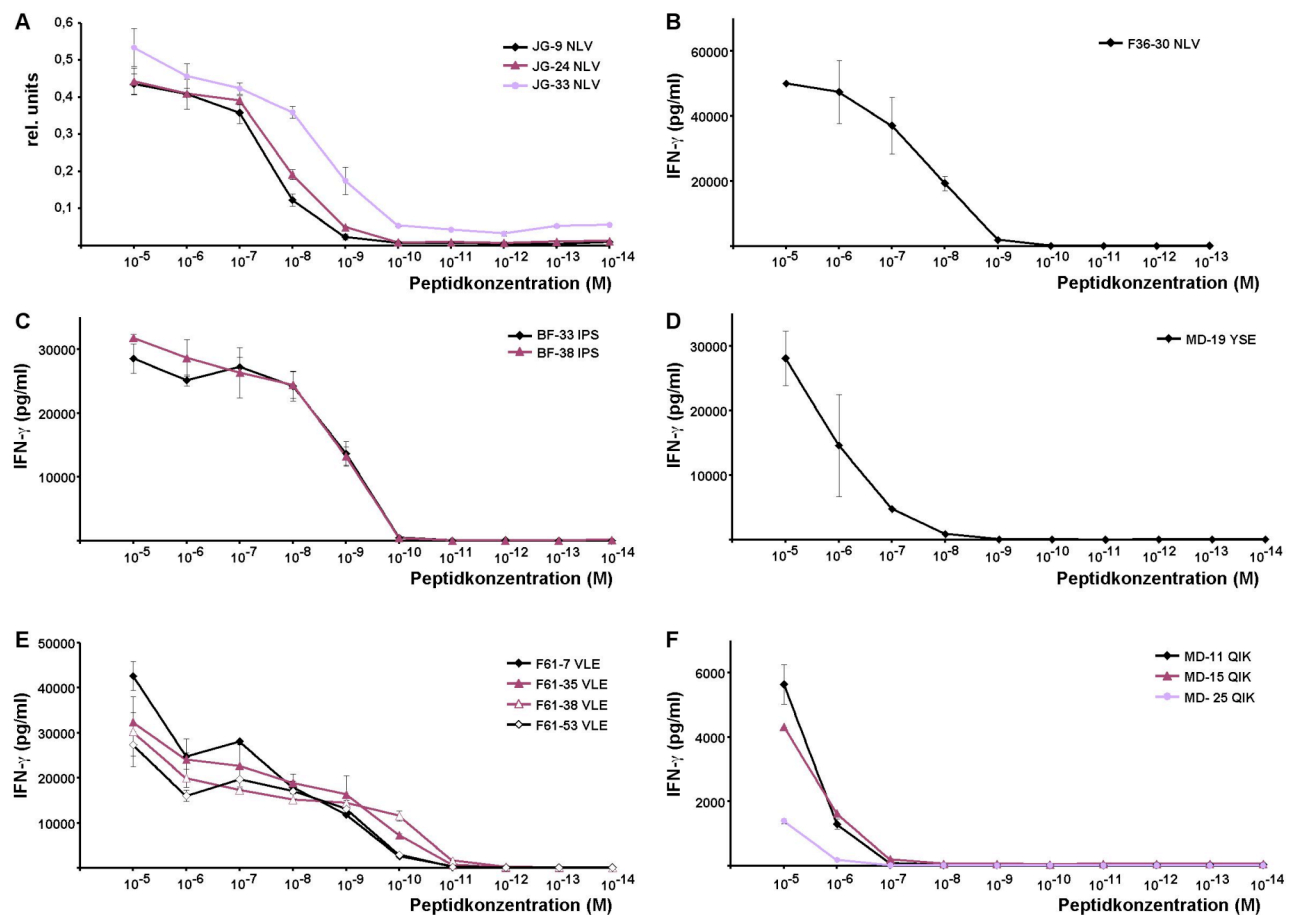


Abbildung 5-10: Evaluation der funktionellen Avidität der CMV-spezifischen T-Zellklone. Die NLV-spezifischen T-Zellklone der Spender JG (A) und F36 (B), die IPS-spezifischen T-Zellklone des Spenders BF (C), der YSE-spezifische T-Zellklon des Spenders MD (D), die QIK-spezifischen T-Zellklone des Spenders MD (E) sowie die VLE-spezifischen T-Zellklone des Spenders F61 (F) wurden mit allogenen zur HLA-Restriktion der T-Zellklone passenden B-Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen des entsprechenden CMV-Peptids kokultiviert. Die Menge an ausgeschüttetem IFN- γ im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikaten gezeigt.

Zur **Charakterisierung des TCRs der CMV-spezifischen T-Zellklone**, habe ich zunächst die Expression der TCR V β -Kette mit Hilfe des von der Firma Beckman Coulter (Krefeld) erhältlichen TCR V β -Antikörper-Kits (IOTest TCR V β repertoire analysis) durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 5-11). Zusätzlich wurde die Gensequenz der α - und β -Kette der CMV-spezifischen TCRs mittels TCR-subfamilienspezifischer PCR genauer charakterisiert. Die CDR3-Regionen und

die Verwendung der V- und J-Gensegmente sind in Tabelle 5-II zusammengefasst. Die NLV-spezifischen T-Zellklone des Spenders JG verwenden unterschiedliche TRAV- und TRBV-Gene. Der TCR NLV2 der T-Zellklone JG-9 und JG-24 ist ein sogenannter "*public*" TCR und wird auch von dem T-Zellklon RZ-20 des Spenders RZ verwendet. Außerdem haben bereits einige andere Arbeitsgruppen NLV-spezifische T-Zellen, die die gleiche TCR α -Kette oder β -Kette bzw. eng verwandte Varianten verwenden, von anderen Spendern beschrieben (Price et al., 2005; Trautmann et al., 2005; Venturi et al., 2008; Weekes et al., 1999). Eine um zwei Aminosäuren abweichende Variante der β -Kette des VLE-spezifischen TCRs VLE2 (CDR3 β -Region: CAS **S**WDSQSSGN**S**I YFG) wurde von Khan und Kollegen bereits bei VLE-spezifischen T-Zellen eines anderen Spenders gefunden (Khan et al., 2002), was darauf hin deutet, dass der TCR VLE2 wahrscheinlich auch ein "*public*" TCR ist. Die anderen charakterisierten TCRs wurden bisher noch nicht beschrieben. Interessanterweise verwendet der NLV-spezifische T-Zellklon JG-33 eine TCR α -Kette mit einer sehr kurzen CDR3-Region. Es könnte daher interessant sein, in Zukunft die Struktur, die zur Antigenerkennung durch den TCR NLV3 führt, zu untersuchen.

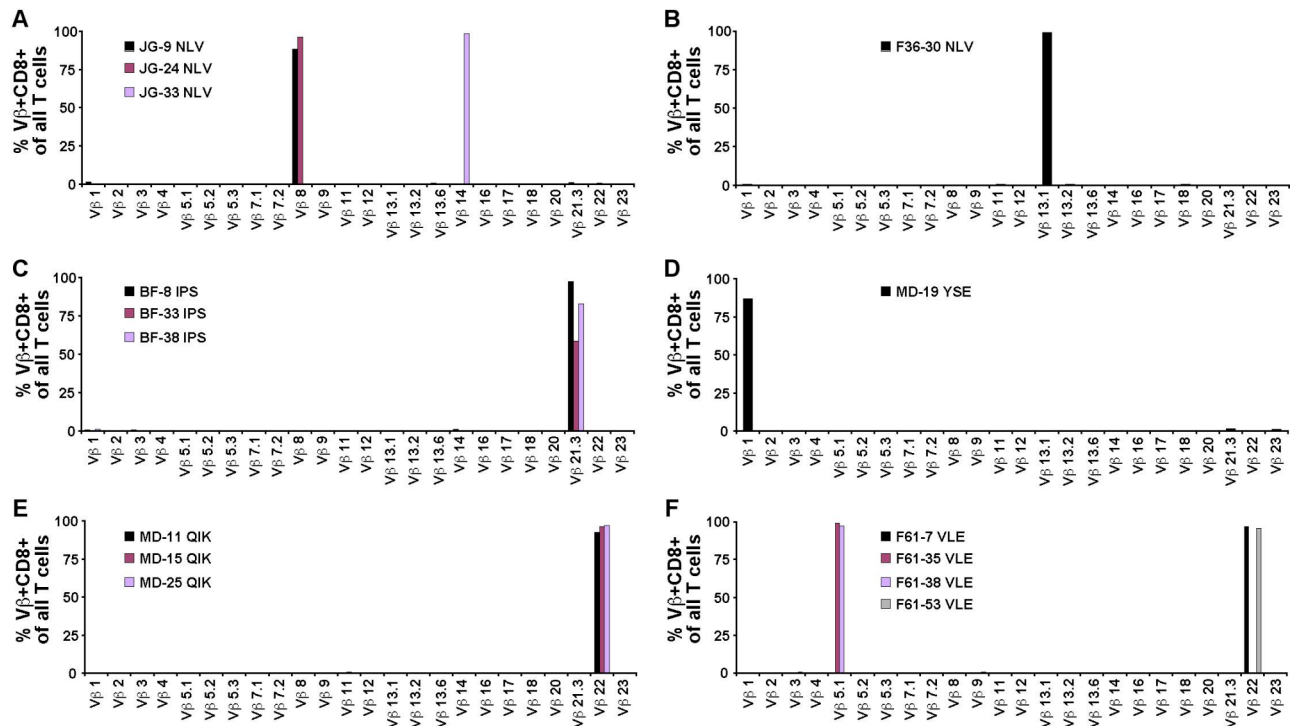


Abbildung 5-11: Bestimmung der TCR V β -Expression mittels durchflusszytometrischer Analyse der CMV-spezifischen T-Zellklone. Die T-Zellklone wurden mit Hilfe des TCR V β -Antikörper-Kits (IOtest TCR V β repertoire analysis, Beckman Coulter, Krefeld) und anti-CD8-Antikörper gefärbt. In den obigen Diagrammen wurden die Anteile der mit dem jeweiligen V β -Antikörper gefärbten CD8⁺ T-Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation zusammengefasst. TCR-Nomenklatur nach Arden (Arden et al., 1995).

Tabelle 5-II: TCR-Verwendung der CMV-spezifischen T-Zellklone

Klon	Epitop	HLA- Restriktion	TCR α-Kette *				TCR β-Kette *				TCR- Name		
			AV	CDR3 α		AJ	BV	CDR3 β		BJ			
pp65-spezifisch													
RZ-20	NLV	A*0201	35*02	CAG PMKTSYDKV	IFG	50*01	12-4*01	CAS	SSANYGY	TFG	1-2*01	NLV1	
JG-9	NLV	A*0201	35*02	CAG PMKTSYDKV	IFG	50*01	12-4*01	CAS	SSANYGY	TFG	1-2*01	NLV2	
JG-24	NLV	A*0201	35*02	CAG PMKTSYDKV	IFG	50*01	12-4*01	CAS	SSANYGY	TFG	1-2*01	NLV2	
JG-33	NLV	A*0201	3*01	CAV		FFG	35*01	27*01	CAS	SPTGGSPSPL	HFG	1-6*01	NLV3
F36-30	NLV	A*0201	21*01	CAV LFHSNSGYAL	NFG	41*01	6-5*01	CAS	SYSRVLNNEQ	FFG	2-1*01	NLV4	
BF-33	IPS	B*3501	5*01	CAE RGWDNDM	RFG	43*01	11-2*01	CAS	SADSNGEL	FFG	2-2*01	IPS	
BF-38	IPS	B*3501	5*01	CAE RGWDNDM	RFG	43*01	11-2*01	CAS	SADSNGEL	FFG	2-2*01	IPS	
MD-19	YSE	A*0101	12-1*01	CVA WGGYSSASKI	IFG	3*01	9*01	CAS	SVVGDEQ	YFG	2-7*01	YSE	
MD-25P	RPH	A*1101 oder B*1501	14	CAM REEGGKL	IFG	23*01	10-3	CAI	SATGGVTYEQ	YFG	2-7*01	RPH	
MD-21	KVYL	DRB1*11 (?)	12-1*01	CVA WGGYSSASKI	IFG	3*01	5-6*01	CAS	SLVRSEQ	YFG	2-7*01	KVYL	
F46-17	RPHE	DRB1*15 oder DQB1*06	36	CAV AFYGGATNKL	IFG	32*02	5-1*01	CAS	SSRTANTEA	FFG	1-1*01	RPHE	
IE-1-spezifisch													
F61-7	VLE	A*0201	17*01	CAT APRDDKI	IFG	30*01	2*01	CAS	KSGTGNYNEQ	FFG	2-1*01	VLE1	
F61-35	VLE	A*0201		nicht bestimmt			5-1*01	CAS	SADSQSSGNTI	YFG	1-3*01	VLE2	
F61-38	VLE	A*0201		nicht bestimmt			5-1*01	CAS	SADSQSSGNTI	YFG	1-3*01	VLE2	
F61-53	VLE	A*0201	17*01	CAT APRDDKI	IFG	30*01	2*01	CAS	KSGTGNYNEQ	FFG	2-1*01	VLE1	
MD-11	QIK	B*0801	19*01	CAL RYYGGSQGNL	IFG	42*01	2*01	CAS	SGSTGQTMNTEA	FFG	1-1*01	QIK	
MD-15	QIK	B*0801	19*01	CAL RYYGGSQGNL	IFG	42*01	2*01	CAS	SGSTGQTMNTEA	FFG	1-1*01	QIK	
MD-25	QIK	B*0801	19*01	CAL RYYGGSQGNL	IFG	42*01	2*01	CAS	SGSTGQTMNTEA	FFG	1-1*01	QIK	

* TCR-Nomenklatur nach IMGT (Lefranc, 2003)

5.1.3 Retroviraler Transfer der CMV-spezifischen TCRs in TCR $\alpha\beta$ -defiziente T-Zelllinien

Die TCR α - und β -Ketten der pp65- bzw. IE-1-spezifischen TCRs NLV2, NLV3, IPS, YSE, RPHE, KVYL, VLE und QIK wurden einzeln in das retrovirale Vektorplasmid pMP71Gpre eingefügt.

Zur ersten detaillierten Analyse des retroviralen Transfers CMV-spezifischer TCRs habe ich vier verschiedene pp65-spezifische TCRs mit drei unterschiedlichen HLA-Restriktionen ausgewählt: zwei HLA-A*0201-restringierte TCRs NLV2 und NLV3, sowie den HLA-A*0101-restringierten YSE-TCR und den HLA-B*3501-restringierten IPS-TCR. Um die Expression des transgenen TCRs in Abwesenheit eines endogenen TCRs zu untersuchen, habe ich die CMV-spezifischen TCR-Gene retroviral zunächst in TCR $\alpha\beta$ -defiziente J76-Zellen und in J76CD8-Zellen, die zusätzlich noch die humane CD8 α -Kette exprimieren, transferiert (Abbildung 5-12). Alle TCRs wurden an der Oberfläche von J76CD8-Zellen exprimiert und konnten mit dem entsprechenden Peptid/HLA-Multimer gefärbt werden. Die Anzahl der CMV-multimerpositiven Zellen nach TCR-Transfer in J76-

Zellen ohne CD8 α war reduziert. Es konnten jedoch alle TCRs, außer dem IPS-TCR, auf diesen Zellen detektiert werden. Die TCRs NLV2, NLV3 und YSE brauchen also CD8 nicht unbedingt, um stabil an ihren Peptid/HLA-Komplex zu binden.

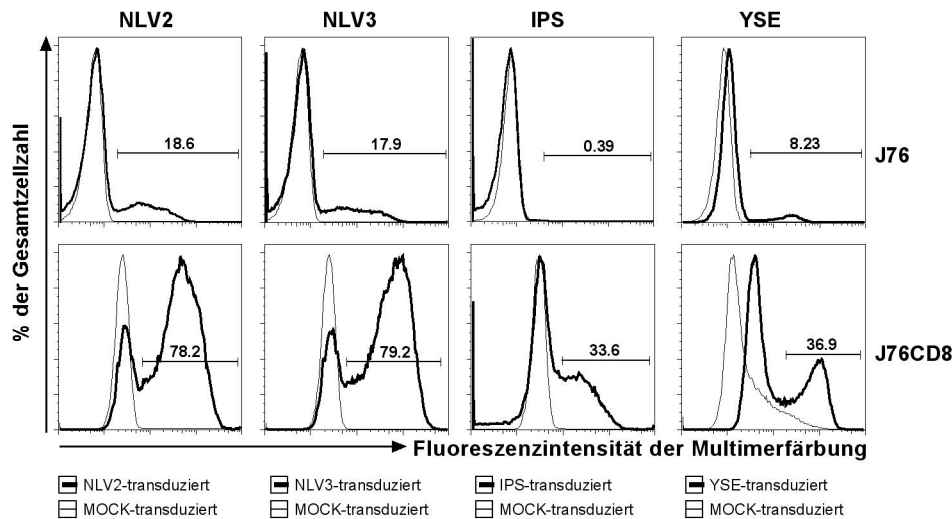


Abbildung 5-12: Transfer vier CMV-spezifischer TCRs in die TCR $\alpha\beta$ -defizienten T-Zelllinien J76 und J76CD8. Die CMV-spezifischen TCRs NLV2, NLV3, IPS und YSE wurden retroviral in J76-Zellen und J76CD8-Zellen exprimiert. Die Oberflächenexpression des transgenen TCRs wurde durch Färbung mit dem entsprechenden Peptid/HLA-Multimer (dicke Linie) 4 Tage nach Transfer analysiert. Als Kontrolle wurden mock-transduzierte Zellen durch Färbung mit dem selben Multimer (dünne Linie) analysiert.

5.1.4 Retroviraler Transfer der CMV-TCRs in primäre T-Zellen CMV-seronegativer Spender

Um CMV-spezifische Reaktivität auf primäre T-Zellen CMV-seronegativer Spender zu übertragen, habe ich die vier CMV-spezifischen TCRs mittels retroviralem Transfer in PBMCs der Spender AS, SI, AM, MB und RR eingebracht. Diese Spender waren für das entsprechende HLA-Allel passend zum transferierten TCR positiv. Vier Tage nach dem Transfer waren alle TCRs auf der Oberfläche der primären T-Zellen exprimiert und konnten mit den CMV-Peptid/HLA-Multimeren gefärbt werden (Abbildung 5-13). Die mock-transduzierten PBMCs hingegen waren multimernegativ.

Die Häufigkeit der multimerpositiven Zellen war vergleichbar zwischen verschiedenen Spendern mit unterschiedlichem HLA-Hintergrund, aber die Häufigkeiten waren für jeden der vier verschiedenen CMV-TCRs unterschiedlich (Abbildung 5-13B). Die Anteile an multimerpositiven Zellen waren ähnlich innerhalb der verschiedenen T-Zellsubpopulationen (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), außer für den IPS-TCR. Dieser TCR war auf CD8⁺CD4⁺ Zellen nicht nachweisbar, was, wie auch schon die vorherige Beobachtung, dass dieser TCR nicht auf J76-Zellen zu detektieren ist (Abbildung 5-12), auf eine CD8-Abhängigkeit des IPS-TCRs hindeutet. Die generelle Transduktionseffizienz wurde mit Hilfe eines GFP-exprimierenden Retrovirus bestimmt und war vergleichbar für alle Spender (45-60%).

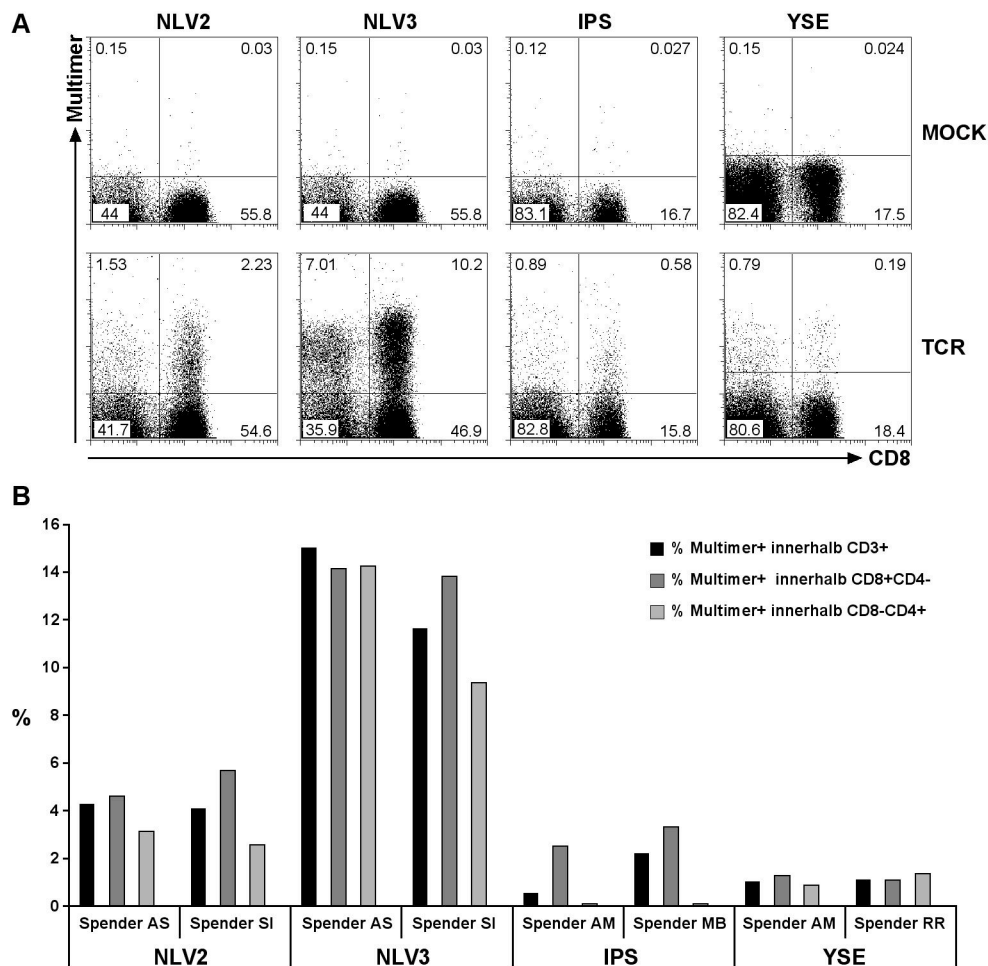


Abbildung 5-13: Transfer der vier CMV-spezifischen TCRs in primäre T-Zellen CMV-seronegativer Spender. (A) PBMCs von CMV-negativen Spendern wurden mit den pp65-spezifischen TCRs NLV2 (Spender AS), NLV3 (Spender AS), IPS (Spender AM) und YSE (Spender AM) transduziert bzw. mock-transduziert. Die Expression des CMV-TCRs wurde durch Färbung mit dem entsprechenden Peptid/HLA-Multimer an Tag 4 nach Transfer analysiert. (B) Die TCRs NLV2, NLV3, IPS und YSE wurden auf PBMCs verschiedener CMV-negativer Spender übertragen. Vier Tage nach Transfer wurde die Häufigkeit CMV-multimerpositiver Zellen innerhalb der verschiedenen T-Zellsubpopulationen ($CD3^+$ Zellen, $CD8^+CD4^-$ Zellen, $CD8^+CD4^+$ Zellen) durch gleichzeitige Färbung mit dem entsprechenden CMV-Multimer und Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 bestimmt.

Um zu überprüfen, ob die TCR-transgenen T-Zellen bereits zu diesem frühen Zeitpunkt eine spezifische Reaktivität gegenüber pp65-exprimierenden Zellen erlangt hatten, habe ich die transduzierten PBMCs an Tag 6 nach TCR-Transfer gegenüber autologen Zellen sowie allogenen Zellen mit zum TCR passendem oder unpassendem HLA-Typ getestet. Die Menge an freigesetztem $IFN-\gamma$ und IL-2 wurde nach Kokultur der T-Zellen mit den pp65-exprimierenden oder pp65-negativen mLCLs sowie den pp65- und EBV-freien BBLs mittels ELISA bestimmt (Abbildung 5-14). NLV2-transduzierte wie auch NLV3-transduzierte PBMCs sezernierten beträchtliche Mengen an $IFN-\gamma$ (Abbildung 5-14A) und etwas IL-2 (Abbildung 5-14B) nach Kokultur mit HLA-A2-positiven pp65-exprimierenden mLCLs. Die Kokultur mit BBL (pp65- und EBV-negativ) führte zu keiner Zytokinfreisetzung, wohingegen beim Test der TCR-transduzierten Zellen gegenüber pp65-negativen mLCLs kleine Mengen an $IFN-\gamma$ ausgeschüttet wurden. Dies deutet darauf hin, dass innerhalb der TCR-transduzierten PBMCs einige EBV-spezifische Gedächtnis-T-Zellen enthalten sind. Diese Beobachtung war nicht unerwartet, weil der PBMC-Spender AS EBV-seropositiv ist.

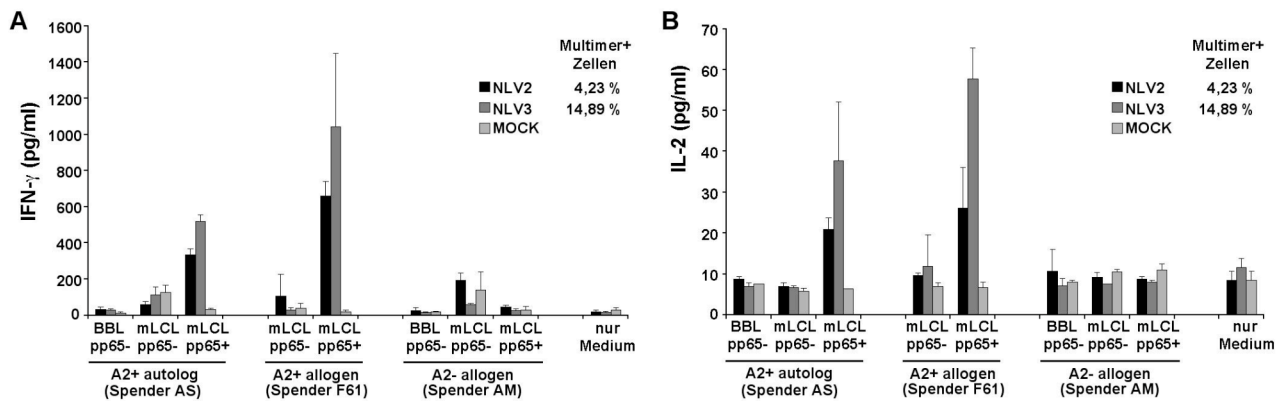


Abbildung 5-14: CMV-spezifische Reaktivität der TCR-transgenen Zellen sechs Tage nach TCR-Transfer. Die spezifische Freisetzung von IFN- γ (A) und IL-2 (B) durch die pp65-spezifischen TCR-transgenen T-Zellen nach Erkennung von endogen prozessiertem Antigen wurde mittels ELISA analysiert. NLV2-, NLV-3- oder mock-transduzierte PBMCs von Spender AS wurden gegenüber autologen, alloge HLA-A2-positiven und alloge HLA-A2-negativen Zielzellen (Spender sind in Klammern angegeben) getestet. Es sind Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikaten gezeigt.

Dieses Ergebnis zeigt, dass CMV-spezifische T-Zellen, die endogen prozessiertes Antigen erkennen, durch ein einfaches 8-Tage-Protokoll sehr schnell aus PBMCs von CMV-negativen Spendern durch TCR-Transfer hergestellt werden können.

5.1.5 Expansion und Anreicherung TCR-transgener T-Zellen mittels antigenspezifischer Stimulation

Für eine erfolgreiche T-Zelltherapie ist es wichtig, dass die TCR-transgenen T-Zellen endogen prozessiertes Antigen erkennen und in der Lage sind, *in vivo* antigenspezifisch zu proliferieren, um eine ausreichende Funktion und eine Aufrechterhaltung der T-Zellen nach dem therapeutischen T-Zelltransfer zu gewährleisten. Deshalb habe ich untersucht, ob die CMV-TCR-transduzierten T-Zellen durch antigenspezifische Stimulation expandiert und angereichert werden können. Als antigenspezifische Stimulatoren habe ich dabei autologe pp65-exprimierende mLCLs, die die endogen prozessierten pp65-Epitope auf HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Molekülen präsentieren (Moosmann et al., 2002; Wiesner et al., 2005), verwendet. Zum Vergleich habe ich eine nicht-spezifische Stimulation der TCR-transduzierten Zellen mit anti-CD3-Antikörper, einer Mischung aus alloge PBMCs von drei unverwandten Spendern und der autologen pp65-negativen mLCL durchgeführt. Das Stimulationsprotokoll ist unter Abbildung 5-15A schematisch zusammengefasst.

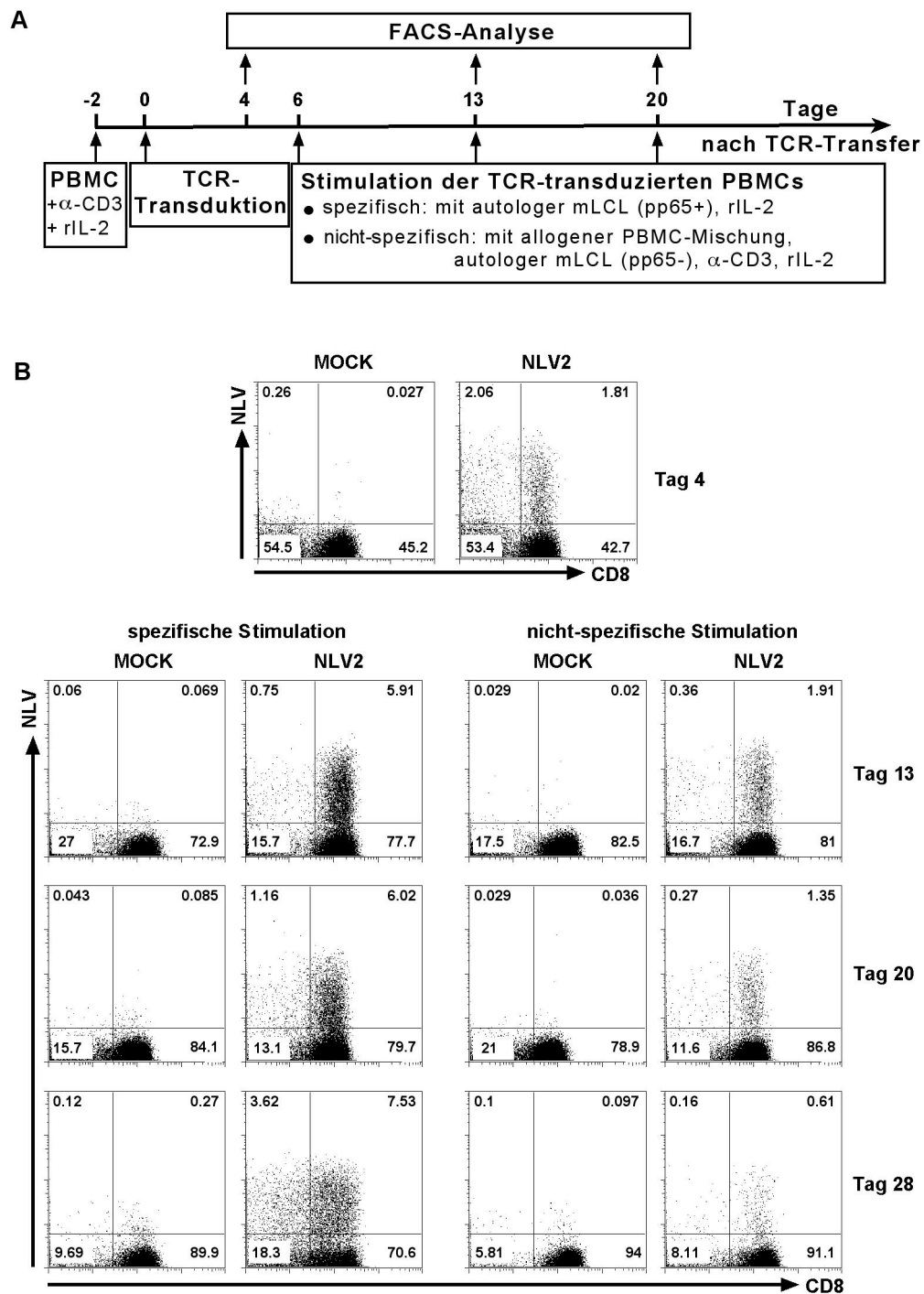


Abbildung 5-15: Anreicherung CMV-spezifischer TCR-transgener T-Zellen durch antigenspezifische Stimulation. (A) Schematischer Überblick über die Stimulation TCR-transduzierter T-Zellen. (B) PBMCs von Spender AS wurden NLV2-TCR- oder mock-transduziert. Anschließend wurde antigenspezifische Stimulation mit nicht-spezifischer Stimulation der Zellen verglichen. Die Häufigkeit von NLV-spezifischen T-Zellen wurde an Tag 4, Tag 13, Tag 20 und Tag 28 nach TCR-Transfer durch Färbung mit NLV-Tetramer und anti-CD8-Antikörper bestimmt.

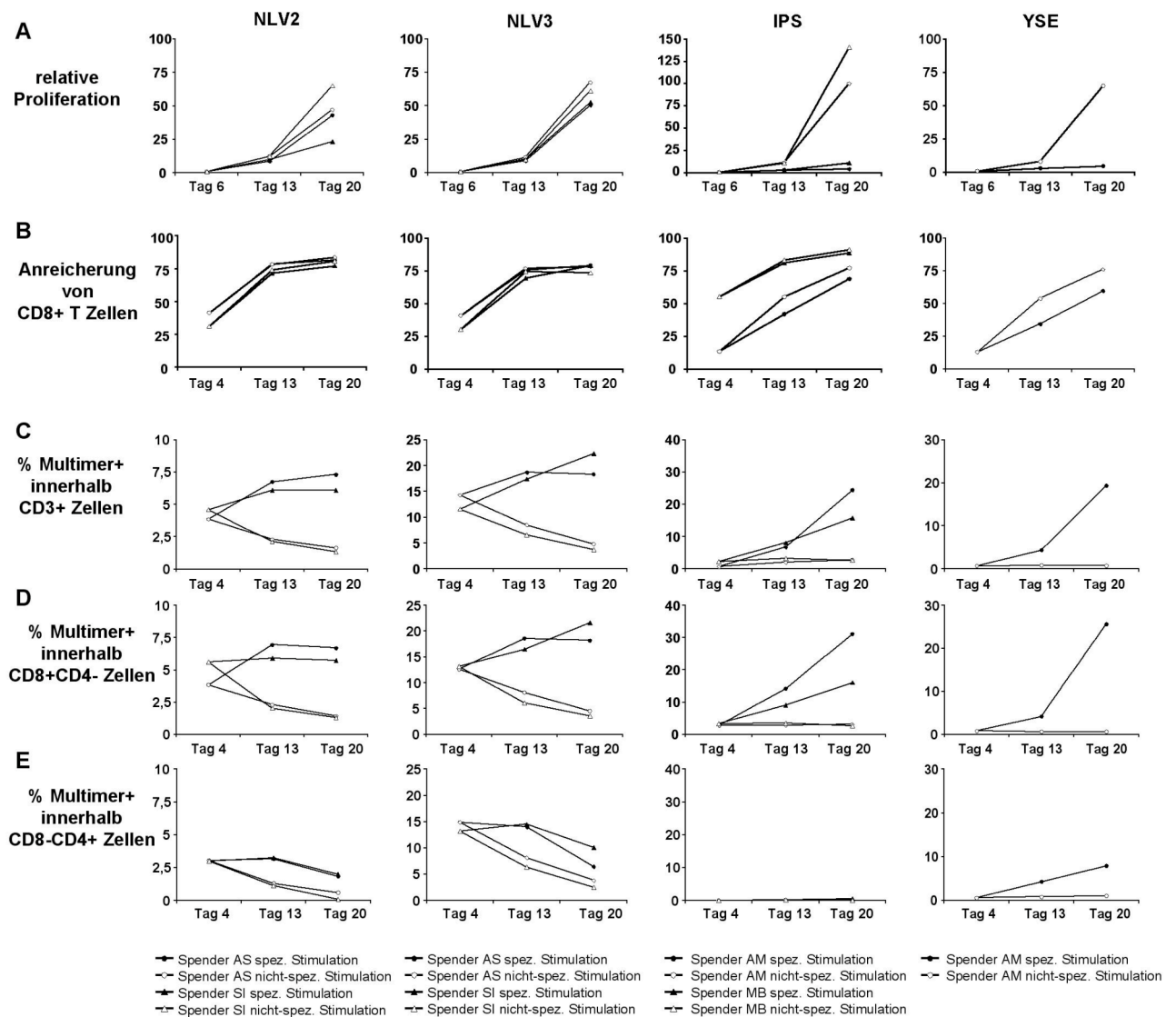


Abbildung 5-16: Expansion und Zusammensetzung von CMV-TCR-transduzierten PBMC-Kulturen während der Stimulation. Die CMV-spezifischen TCRs NLV2, NLV3, IPS und YSE wurden auf PBMCs verschiedener CMV-seronegativer Spender transferiert und anschließend antigenspezifisch oder nicht-spezifisch stimuliert. (A) Die Gesamtzellzahl der Kulturen wurde durch Zählen der lebenden Zellen nach Trypanblaufärbung an Tag 6, Tag 13 und Tag 20 nach Transfer bestimmt. Die Zellzahl an Tag 6 wurde gleich eins gesetzt. Für den IPS-TCR wurde eine andere Skala (von 0 bis 150) verwendet als für die anderen TCRs (von 0 bis 100). (B) Der Anteil CD8⁺ T-Zellen innerhalb der PBMC-Kulturen wurde durch Färbung mit anti-CD8-Antikörper und durchflusszytometrische Analyse an Tag 4, Tag 13 und Tag 20 nach Transfer bestimmt. (C-E) Der Anteil CMV-multimerpositiver Zellen innerhalb der verschiedenen T-Zellsubpopulationen (CD3⁺, CD8⁺CD4⁻ und CD8⁺CD4⁺) während der Stimulationsperiode wurde durch Färbung mit dem entsprechenden Peptid/HLA-Multimer und Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 an Tag 4, Tag 13 und Tag 20 nach Transfer analysiert. Der Anteil an multimerpositiven Zellen innerhalb der mock-transduzierten und kontrollgefärbten TCR-transduzierten Kulturen war unter 0,5%. Für jeden der vier TCRs wurde in C-E eine unterschiedliche Skala verwendet.

Ich konnte für alle vier CMV-TCRs zeigen, dass CMV-TCR-transgene CD3⁺ T-Zellen durch Stimulation mit der das CMV-Antigen pp65 endogen präsentierenden mLCLs spezifisch angereichert werden können (Abbildung 5-16C). Dies ist auch gültig, wenn nur die CMV-TCR-transgenen CD8⁺ T-Zellen evaluiert werden (Abbildung 5-16D). Beispiele von Multimerfärbungen sind in Abbildung 5-15B gezeigt. Wie vor der Stimulation, waren auch während des Stimulationsprozesses für einen bestimmten CMV-TCR die Anteile an TCR-transgenen T-Zellen zwischen den verschiedenen PBMC-Spendern vergleichbar (Abbildung 5-16, C und D). Die antigenspezifische Stimulation führte bei jedem der untersuchten CMV-TCRs zur Expansion der

TCR-transduzierten T-Zellen in Bezug auf absolute Zellzahlen (Abbildung 5-16A). Bei den mit einem der zwei NLV-TCRs transduzierten PBMCs waren antigenspezifische und nicht-spezifische Stimulation in Bezug auf die Expansion der Gesamtkultur vergleichbar (Abbildung 5-16A). Bei den IPS- und YSE-TCR-transduzierten Kulturen führte die nicht-spezifische Stimulation zur stärksten Expansion der Gesamtkultur (Abbildung 5-16, A), wobei jedoch nur die antigenspezifische Stimulation eine Anreicherung der TCR-transgenen Zellen ermöglichte (Abbildung 5-16, C und D). Beide Stimulationsprotokolle expandierten dabei bevorzugt CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 5-16B).

Tabelle 5-III: Expansion und Anreicherung von CMV-TCR-transgenen CD8⁺ T-Zellen durch antigenspezifische und nicht-spezifische Stimulation

CD8 ⁺ multimerpositive Zellen	NLV2		NLV3		IPS		YSE
	Spender AS	Spender SI	Spender AS	Spender SI	Spender AM	Spender MB	Spender AM
Expansion¹							
antigenspezifische Stimulation	148	60	141	224	228	88	672
nicht-spezifische Stimulation	36	40	47	40	640	183	301
Anreicherung²							
antigenspezifische Stimulation	1,74	1,02	1,44	1,64	11,15	4,78	31,6
nicht-spezifische Stimulation	0,37	0,23	0,23	0,27	1,13	0,79	0,79

¹ Die Expansion der CMV-TCR-transgenen CD8⁺ T-Zellen wurde durch Division der absoluten Zahl multimerpositiver CD8⁺ T-Zellen an Tag 20 durch die absolute Zahl multimerpositiver CD8⁺ T-Zellen an Tag 4 berechnet (siehe auch Abbildung 5-16). An Tag 6 und Tag 13 wurden die Zellen antigenspezifisch oder nicht-spezifisch stimuliert (siehe Abbildung 5-16).

² Die Anreicherung der CMV-TCR-transgenen CD8⁺ T-Zellen wurde durch Division des Anteils multimerpositiver CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtkultur an Tag 20 durch den Anteil multimerpositiver CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtkultur an Tag 4 berechnet (siehe auch Abbildung 5-16).

Aus diesen Daten habe ich die Erhöhung der absoluten Zahl an TCR-transgenen CD8⁺ T-Zellen (Expansion) sowie die Erhöhung des Anteils an TCR-transgenen CD8⁺ T-Zellen (Anreicherung) nach antigenspezifischer bzw. nicht-spezifischer Stimulation berechnet (Tabelle 5-III). Für jeden TCR führten beide Stimulationsbedingungen zu einer beeindruckenden Expansion von CD8⁺ T-Zellen, die den transgenen CMV-TCR exprimierten (36-672-fach, Tabelle 5-III). Mit Ausnahme der IPS-TCR-transgenen T-Zellen, resultierte die antigenspezifische Stimulation in einer stärkeren Expansion im Vergleich zur nicht-spezifischen Stimulation. Für alle vier TCRs war die Anreicherung TCR-transgener CD8⁺ T-Zellen nach antigenspezifischer Stimulation stärker als nach nicht-spezifischer Stimulation (Tabelle 5-III). Dies zeigt, dass das endogen prozessierte Antigen eine solide und spezifische Expansion und Anreicherung von CMV-TCR-tragenden T-Zellen stimuliert.

Interessanterweise blieben auch CD4⁺ T-Zellen, die diese HLA-Klasse-I-restringierten TCRs exprimierten, durch die antigenspezifische Stimulation in der T-Zellkultur erhalten (NLV2, NLV3) oder wurden dadurch sogar expandiert (YSE) (Abbildung 5-16E). Eine Ausnahme waren hier IPS-TCR-transgene Zellen. Dieser TCR war auch der einzige TCR, der nicht auf den CD8-negativen J76-Zellen detektiert werden konnte (Abbildung 5-12).

Sowohl während der spezifischen als auch während der nicht-spezifischen Stimulation waren keine großen Variationen der Intensität der Multimerfärbung zu beobachten, wie am Beispiel NLV2-TCR-transduzierter Zellen von zwei Spendern in Abbildung 5-17 gezeigt ist. Dies bedeutet, dass die TCR-Expressionsniveaus an der Oberfläche während des Stimulationsprozesses relativ stabil waren.

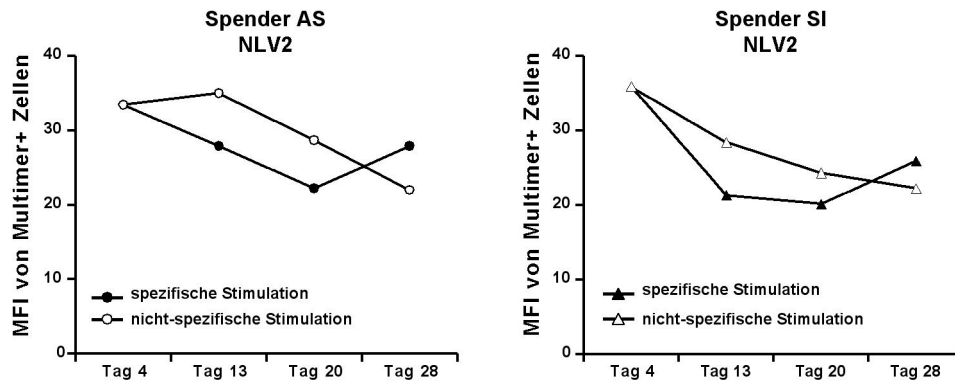


Abbildung 5-17: Intensität der Multimerfärbung von NLV2-TCR-transduzierten Zellen im Stimulationsverlauf. PBMCs der Spender AS und SI wurden mit dem NLV2-TCR transduziert und anschließend antigenspezifisch oder unspezifisch stimuliert. An Tag 4, 13, 20 und 28 wurden die Zellen mit NLV-Tetramern und anti-CD8-Antikörpern gefärbt. Es ist das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität der eingegrenzten CD8⁺NLV⁺ Zellen dargestellt.

5.1.6 Reaktivität CMV-TCR-transgener T-Zellen nach antigenspezifischer und nicht-spezifischer Stimulation

Um zu überprüfen, ob die CMV-TCR-transgenen T-Zellen ihre spezifische Funktion nach der antigenspezifischen Stimulation behalten haben, habe ich nach drei Stimulationsrunden erneut die pp65-spezifische Freisetzung von Effektorzytokinen getestet. Die antigenspezifisch oder nicht-spezifisch stimulierten TCR-transduzierten Kulturen wurden mit einer Anzahl von endogen pp65-exprimierenden Zielzellen sowie HLA-unpassenden und pp65-negativen Kontrollen kokultiviert (Abbildung 5-18). Gegenüber der Situation sechs Tage nach TCR-Transfer (Abbildung 5-14), war eine stark erhöhte IFN- γ -Sekretion für jede der CMV-TCR-transduzierten T-Zelllinien nach antigenspezifischer Expansion nachweisbar (Abbildung 5-18, A und B). Nach nicht-spezifischer Expansion war die IFN- γ -Freisetzung weit geringer (Abbildung 5-18, A und B), was zu den niedrigeren Anteilen an multimerpositiven Zellen passt (Abbildung 5-16C). Die nicht zur HLA-Restriktion des CMV-TCRs passenden sowie auch die pp65-negativen Kontrollen wurden nur sehr schwach erkannt. Wie erwartet, zeigten die mock-transduzierten T-Zellkulturen keine pp65-spezifische Reaktivität.

Außerdem setzten die TCR-transduzierten und antigenspezifisch stimulierten T-Zelllinien nach Erkennung von endogenem prozessiertem pp65 beträchtliche Mengen an IL-2 frei (Abbildung 5-18C). Die nicht-spezifisch stimulierten T-Zelllinien hingegen schütteten kein IL-2 aus.

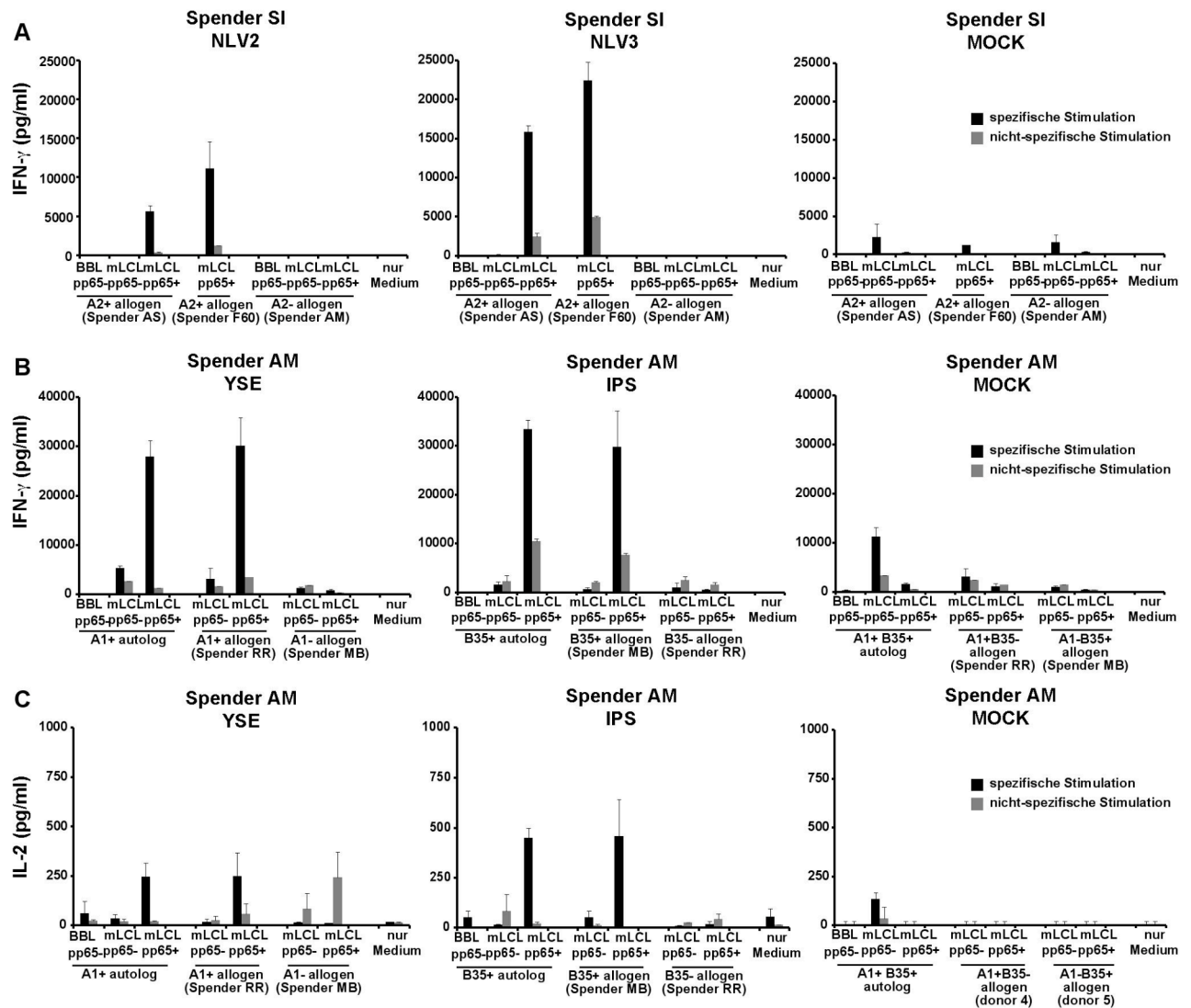


Abbildung 5-18: CMV-spezifische Freisetzung von Effektorzytokinen durch CMV-TCR-transduzierte PBMCs nach drei Stimulationsrunden. PBMCs der CMV-seronegativen Spender (A, Spender SI; B und C, Spender AM) wurden wie angegeben mit den verschiedenen CMV-spezifischen TCRs transduziert oder mock-transduziert. Anschließend wurden drei Runden antigenspezifische Stimulation oder nicht-spezifische Stimulation durchgeführt. Die CMV-spezifische Reaktivität der TCR-transgenen T-Zellen gegenüber Zellen, die das Zielantigen pp65 endogen exprimieren, wurde mittels IFN- γ -ELISA (A und B) und IL-2-ELISA (C) an Tag 25 nach TCR-Transfer analysiert. Als Zielzellen wurden autologe und allogene (passend oder unpassend zur HLA-Restriktion des transgenen TCRs) pp65-exprimierende mLCLs, Kontroll-mLCLs und CD40-aktivierte B-Blasten (BBLs) verwendet. Es sind Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikation gezeigt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die antigenspezifische Stimulation die spezifische Funktion der TCR-transduzierten T-Zellen signifikant intensiviert (Abbildung 5-18), was mit dem Anstieg der CMV-multimerpositiven T-Zellen zusammenhängt (Abbildung 5-16). Um die Stabilität der antigenspezifischen Funktion der TCR-transgenen T-Zellen noch präziser zu quantifizieren, habe ich die Menge an IFN- γ , die pro multimerpositive T-Zelle vor und nach drei Runden antigenspezifischer Stimulation ausgeschüttet wurde, berechnet. Dabei habe ich angenommen, dass nur multimerpositive T-Zellen nach Kontakt mit CMV-antigenpräsentierenden Zellen IFN- γ freisetzen. Wie am Beispiel der NLV2-transduzierten Zellen in Abbildung 5-19 gezeigt ist, war die Menge an freigesetztem Zytokin nach der antigenspezifischen Stimulation 12-mal höher verglichen mit der Situation vor Stimulation. Nicht-spezifische Stimulation führte zu einem 2,6-fachen Anstieg der Zytokinsekretion pro Zelle. Die antigenspezifische Funktion scheint also eine dauerhafte

Eigenschaft TCR-transgener T-Zellen zu sein. Die funktionelle Kapazität dieser Zellen kann sogar noch intensiviert werden, etwa durch wiederholten Kontakt mit endogen prozessiertem Antigen.

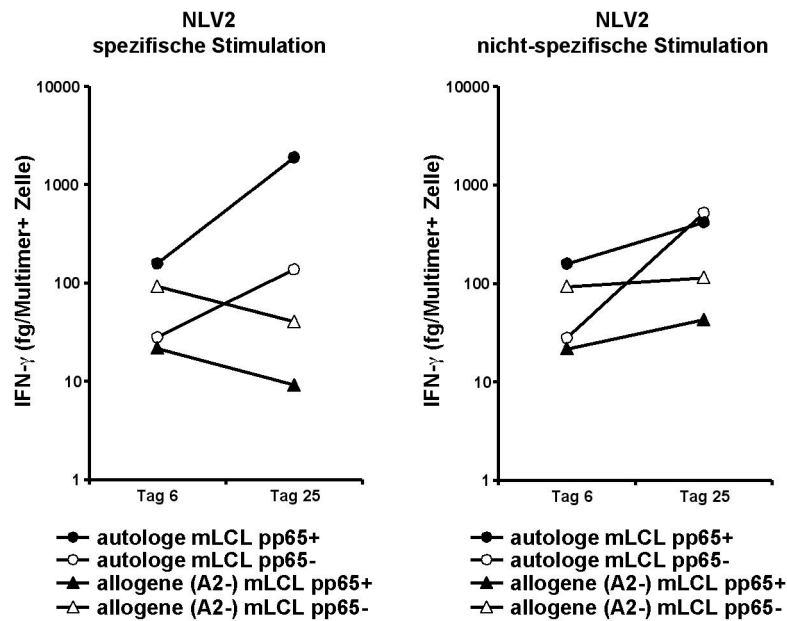


Abbildung 5-19: Mittlere CMV-spezifische Zytokinfreisetzung jeder multimerpositiven Zelle vor und nach Stimulation der CMV-TCR-transduzierten PBMCs. PBMCs des CMV-seronegativen Spenders AS wurden mit dem NLV2-TCR transduziert und die IFN- γ -Sekretion in Reaktion auf Zielzellen wurden vor (Tag 6) und nach (Tag 25) drei Runden antigenspezifischer (links) oder nicht-spezifischer (rechts) Stimulation mittels ELISA quantifiziert. Zielzellen waren hierbei autologe oder zur HLA-Restriktion des CMV-TCRs unpassende pp65-mLCLs sowie Kontroll-mLCLs. Die Zytokinfreisetzung pro multimerpositive Zelle wurde ermittelt, indem die Gesamtmenge an im Reaktionsüberstand detektiertem Zytokin durch die Gesamtzellzahl in der Reaktion geteilt und mit dem Anteil an multimerpositiven Zellen multipliziert wurde. Dieser Anteil wurde näherungsweise aus der Peptid/HLA-Multimerfärbung zum nächstliegenden Zeitpunkt (4,23% an Tag 4 vor Stimulation; 11,2% an Tag 28 nach spezifischer Stimulation; 0,79% an Tag 28 nach nicht-spezifischer Stimulation) entnommen.

Die antigenspezifische Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen ist essentiell für die Kontrolle von viralen Infektionen. Deshalb habe ich nach drei Stimulationsrunden auch die antigenspezifische Lyse durch die expandierten CMV-TCR-transgenen T-Zellen in Kokulturen mit pp65-positiven und pp65-negativen Zielzellen untersucht (Abbildung 5-20). Nach antigenspezifischer Stimulation lysierten die NLV2-TCR-transduzierten T-Zellen bis hin zu niedrigen Effektor:Zielzell-Verhältnissen die autologen pp65-exprimierenden mLCLs sehr effizient. Die nicht HLA-abgestimmten pp65-mLCLs, die pp65-negativen mLCLs und auch die BBLs wurden nicht oder nur sehr schwach erkannt und von den T-Zellen abgetötet (Abbildung 5-20A). Nach nicht-spezifischer Stimulation lysierten die NLV2-TCR-transduzierten T-Zellen die pp65-positiven Zellen weniger effizient und zeigten außerdem eine erhöhte Reaktivität gegenüber den autologen und allogenen Kontroll-mLCLs. Mock-transduzierte PBMCs zeigten ein EBV-spezifisches oder nicht-spezifisches Reaktionsmuster (Abbildung 5-20A). Ähnlich zum NLV2-TCR-Transfer resultierte der Transfer der anderen drei CMV-TCRs auf primäre T-Zellen und die anschließende Stimulation in einer effizienten CMV-spezifischen Lyse der Zielzellen (Abbildung 5-20B). In jedem Fall war die Spezifität und Intensität der Zytotoxizität nach antigenspezifischer Stimulation höher.

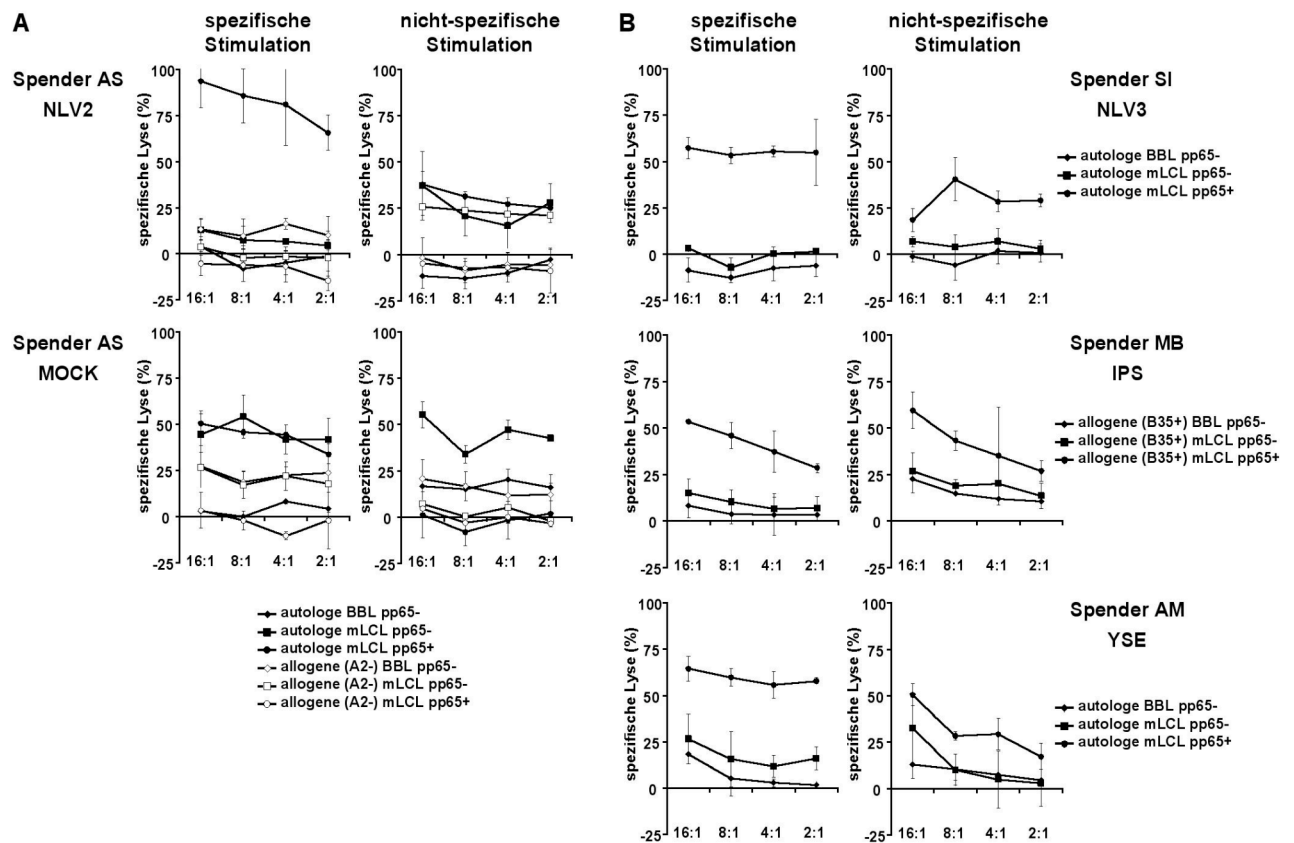


Abbildung 5-20: CMV-antigenspezifische Zytotoxizität der CMV-TCR-transduzierten PBMCs nach drei Stimulationsrunden. PBMCs von verschiedenen CMV-seronegativen Spendern wurden wie angegeben mit den unterschiedlichen CMV-spezifischen TCRs transduziert oder mock-transduziert. Anschließend wurden drei Runden antigenspezifische oder nicht-spezifische Stimulation durchgeführt. Die zytotoxische Reaktivität der TCR-transgenen T-Zellen gegenüber CMV-antigenexprimierenden Zielzellen wurde mittels Calcein-Freisetzungstest an Tag 25 oder 26 nach TCR-Transfer analysiert. (A) NLV2-transduzierte und mock-transduzierte Zellen von Spender AS wurden gegenüber autologen und allogenen nicht HLA-abgestimmten mLCLs, die entweder pp65 exprimierten oder nicht, wie auch gegenüber CD40-aktivierten B-Blasten (BBL) in verschiedenen, angegebenen Effektor:Zielzell-Verhältnissen getestet. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten gezeigt. (B) NLV3-, IPS- und YSE-transduzierte Zellen von verschiedenen Spendern wurden gegenüber autologen und allogenen nicht HLA-abgestimmten mLCLs, die entweder pp65 exprimierten oder nicht, wie auch gegenüber CD40-aktivierten B-Blasten (BBL) in verschiedenen, angegebenen Effektor:Zielzell-Verhältnissen getestet. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten gezeigt.

5.1.7 Gedächtnis-Phänotyp CMV-TCR-transgener T-Zellen

CCR7 und CD62L vermitteln die Wanderung der antigenspezifischen T-Zellen in die Lymphknoten und ihre Expression charakterisiert Gedächtnis-T-Zellen des *central memory*-Phänotyps (T_{CM}). Ich habe die Expression dieser T-Zellmarker an der Oberfläche von CMV-TCR-transgenen T-Zellen nach TCR-Transfer (Tag 6) und nach antigenspezifischer bzw. nicht-spezifischer Stimulation (Tag 13, Tag 20) untersucht. Die Expression von CCR7 und CD62L durch die NLV-TCR-exprimierenden Zellen war sehr ähnlich wie die Expression der beiden Marker innerhalb der Gesamtkultur (Abbildung 5-21). Die Anteile von CCR7-positiven und CD62L-positiven Zellen wurden im Laufe der Kulturzeit weniger. Es waren jedoch auch noch an Tag 20 nach spezifischer Expansion der Zellen mehr als 15% der CMV-TCR-positiven bzw. aller T-Zellen positiv für diese Gedächtnis-T-Zellmarker.

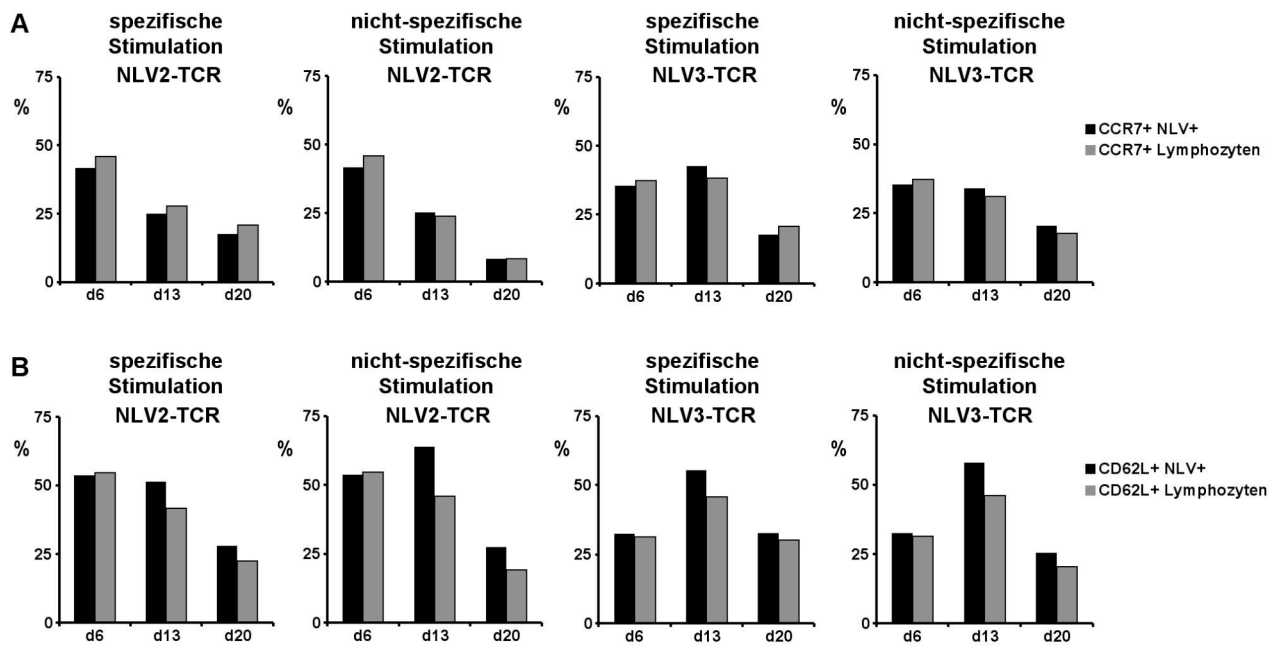


Abbildung 5-21: Expression zentraler Gedächtnis-T-Zellmarker auf CMV-TCR-transgenen T-Zellen während der Stimulation. PBMCs des CMV-seronegativen Spenders AS wurden mit dem CMV-spezifischen NLV2-TCR oder NLV3-TCR retroviral transduziert und anschließend antigenspezifisch oder nicht-spezifisch stimuliert. (A) Die Häufigkeit von CCR7-positiven T-Zellen wurde durch Färbung mit CCR7-spezifischem Antikörper und NLV-Tetramer an Tag 6, Tag 13 und Tag 20 nach TCR-Transfer analysiert. Es ist der Anteil der CCR7-positiven Zellen innerhalb der NLV-tetramerpositiven Zellen sowie der Anteil der CCR7-positiven Zellen innerhalb der Gesamtkultur gezeigt. (B) Analog wurde die Häufigkeit von CD62L-positiven T-Zellen durch Färbung mit CD62L-spezifischem Antikörper und NLV-Tetramer an Tag 6, Tag 13 und Tag 20 nach TCR-Transfer analysiert. Es ist der Anteil der CD62L-positiven Zellen innerhalb der NLV-tetramerpositiven Zellen sowie der Anteil der CD62L-positiven Zellen innerhalb der Gesamtkultur gezeigt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Teil der CMV-TCR-transgenen T-Zellen seinen *central memory*-Phänotyp nach wiederholtem Antigenkontakt behält. Dies könnte zu einer Etablierung eines TCR-transgenen CMV-spezifischen T-Zellgedächtnis im Patienten nach Immuntherapie beitragen.

5.2 Generierung und Charakterisierung von HHV-6-spezifischen T-Zellen

Die Reaktivierung von Herpesviren wie EBV, CMV oder HHV-6 in immunsupprimierten Patienten, z.B. nach einer Knochenmarkstransplantation, führt zu schwerwiegenden Erkrankungen (Moss und Rickinson, 2005). Komplikationen, die durch EBV oder CMV hervorgerufen werden, können durch die Verabreichung von virusspezifischen T-Zellen verhindert oder therapiert werden (Einsele et al., 2002; Riddell et al., 1992; Rooney et al., 1998). Eine adoptive T-Zelltherapie von HHV-6-induzierten Erkrankungen ist derzeit allerdings nicht möglich, weil weder die Häufigkeit HHV-6-spezifischer T-Zellen bei gesunden HHV-6-positiven Spendern noch T-Zellepitope und Hauptantigene der HHV-6-spezifischen T-Zellantwort bekannt sind. Dieses Wissen ist jedoch zur effizienten Herstellung von virusspezifischen T-Zellen für die Therapie notwendig.

Ziel dieser Arbeit war es, erste Epitope der HHV-6-spezifischen T-Zellantwort zu charakterisieren und das Reaktivitätsspektrum HHV-6-spezifischer T-Zellen *in vitro* zu untersuchen. Darüber hinaus sollte die Häufigkeit dieser HHV-6-spezifischen T-Zellen im Blut gesunder Virusträger analysiert werden.

5.2.1 Auswahl von Peptiden als HHV-6-Epitopkandidaten

Für die Auswahl potentiell immunogener HHV-6-Proteine wurde die Homologie zu CMV – ebenfalls ein β -Herpesvirus – in Betracht gezogen. Die CMV-spezifische T-Zellantwort ist wie schon erwähnt gut charakterisiert und richtet sich hauptsächlich gegen die Tegumentproteine pp65 und pp150 sowie gegen das Nukleoprotein IE-1 (Elkington et al., 2003; Sylwester et al., 2005). Als Zielantigene zur Identifikation von ersten HHV-6-spezifischen T-Zellepitopen wurden deshalb die Homologe zu den CMV-Proteinen ausgewählt. Die von den HHV-6-Genen U11 und U54 kodierten Proteine sind homolog zu CMV-pp150 und CMV-pp65 (Gompels et al., 1995). Die HHV-6 *immediate early* (IE)-Proteine werden von den Genen U86-U89 (IE-A-Region) und U16-19 (IE-B-Region) kodiert (Gompels et al., 1995). Die IE-A-Region korrespondiert mit den IE-1- und IE-2-Regionen des CMV-Genoms, wobei das U89-Gen das positionelle Homolog zu IE-1 ist. Durch Spleißen der U89-prä-mRNA kann das U90-Genprodukt entstehen. Als potentieller T-Zellantigen wurde in Homologie zu IE-1 das U89-Genprodukt ausgewählt (das U89-Gen ist in der HHV-6B-Gensequenz des Virusstamms Z29 im Genbank-Eintrag NC_000898.1 als U90 bezeichnet). Nachdem die meisten Komplikationen bei immunsupprimierten Patienten, wie bereits erwähnt, hauptsächlich von HHV-6B hervorgerufen werden (Zerr, 2006), wurden die Proteine des HHV-6B-Virusstamms Z29 der T-Zellanalyse zu Grunde gelegt.

Computerbasierte Algorithmen können angewendet werden, um herauszufinden, welche Peptide eines Proteins potentiell auf bestimmten HLA-I-Molekülen präsentiert werden können und somit immunogene CD8⁺ T-Zellepitope darstellen könnten. Für die Vorhersage der Bindungswahrscheinlichkeit verschiedener HHV-6-Peptide an die in der kaukasischen

Bevölkerung häufigen HLA-I-Moleküle HLA-A1, HLA-A*0201, HLA-A24, HLA-B7, HLA-B8 und HLA-B*3501 wurden zusätzlich zu eigenen Überlegungen die Programme BIMAS (Bioinformatics and Molecular Analysis Section, www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla-bind) (Parker et al., 1994) und SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) (Rammensee et al., 1999) verwendet. In diesen Programmen sind den Aminosäuren im Peptid unterschiedliche Bewertungskoeffizienten zugewiesen, welche aus publizierten Erkenntnissen über T-Zellepitope abgeleitet sind. Die Koeffizienten sind abhängig von der jeweiligen Aminosäure, deren Position im Peptid und der Auswahl des HLA-Moleküls.

Tabelle 5-IV: Übersicht über die ausgewählten HHV-6B-Peptide des HHV-6B-Stamms Z29 sowie die homologen Sequenzen in zwei weiteren Stämmen

HHV-6 Antigen	Peptid-nummer	HHV-6B Stamm: Z29 ¹	HHV-6B Stamm: HST ²	HHV-6A Stamm: U1102 ³	HLA-Restriktion	Aminosäure-position
U11 (pp150-Homolog)						
	1	YLVTSINKL	YLVTSINKL	YLITSINKL	A2	188
	2	SLMSGVEPL	SLMSGVEPL	SLMSGVE SP	A2	381
	3	YLGKLFVTL	YLGKLFVTL	YLGKLF LAL	A2	198
	4	GILDFGVKL	GILDFGVKL	GILDF NVKF	A2	413
	5	DLSRDLDSV	DLSRDLDSV	DLSR ELDSA	A2	750
	6	MLWYTVYNI	MLWYTVYNI	MLWYTVYNI	A2	171
	7	DVVNGLANL	DVVNGLANL	DVVNG FANL	A2	450
	8	LYNTFILWL	LYNTFILWL	LYN LLVLWL	A24	60
	9	DYEIIKSSL	DYEIIKSSL	DY DI IKSSL	A24	266
	10	FRKQKKLDL	FRKQKKLDL	FRKQK QSDI	B8	537
	11	LDRDKVQRL	LDRDKVQRL	LDRDKV ERL	B8	13
	12	RPSADLARL	RPSADLARL	KSSLD PARL	B7	318
	13	DPWDENGYL	DPWDENGYL	DPWDENGYL	B7	181
	14	QPKSLDAPL	QPKSLDAPL	NSRSLD SFL	B7	330
U54 (pp65-Homolog)						
	15	LLCGNLLIL	LLCGNLLIL	LLCGNLLIL	A2	195
	16	ILYGPLTRI	ILYGPLTRI	VI YGPLTRI	A2	129
	17	SMGIFLKSL	SMGIFLKSL	NMGIFL SSL	A2	392
	18	DYLLDDTFF	DYLLDDTFF	DYLLDD NFY	A24	210
	19	LPVQRIEAY	LPVQRIEAY	LPVQRIE AH	B35	106
	20	GPLTRIKIY	GPLTRIKIY	GPLTRIKI Q	B35	132
	21	MPPETPQSL	MPPETPQSL	MPP G TPQNL	B7	427
	22	QPVSRAPSL	QPVSRAPSL	QAVLR T PSL	B7	373
U89 (IE-A, IE-1-Homolog)						
	23	LVLEQLGQL (U90)	LVLEQLGQL	L GLEQL S QL	A2	149
	24	KLDKEMEAV (U90)			A2	637
	25	GYPSEDYDPF (U90)	GYPSEDYDPF	GYPSEDYDPF	A24	1063
	26	TAKRKNVPI (U90)	TAKRKNVPI	VAKRK H VSS	B8	748
	27	SKKIKLDRL (U90)	SKKIK IDKL	NKKIK T DQL	B8	761
	28	PSKSKIKL (U90)	PSKSKIK I	SPKN KKIK T	B8	758
	29	ISEMITFGY (U90)	ISEMITFGY	ISEM MM FGY	A1	661
	30	KPRRHQFKI (U90)	KP HR HQFKI	KLLR RGFK V	B7	360

¹ aus Genbank-Sequenz NC_000898.1

² aus Genbank-Sequenz AB021506.1

³ aus Genbank-Sequenz X83413.1

Das Programm BIMAS multipliziert die Bewertungskoeffizienten für jede Aminosäure im Peptid und liefert eine Abschätzung der Halbzeit-Dissoziation: je größer die Zahl, desto stärker ist die Bindung des Peptids an das HLA-Molekül. Der SYFPEITHI-Algorithmus bewertet einigermaßen bis besonders gut passende Aminosäuren in den jeweiligen Positionen mit Werten zwischen 1 und 15, nachteilige Aminosäuren werden mit negativen Koeffizienten belegt, und die Bewertungskoeffizienten werden addiert. Auch hier gilt: Je größer die Zahl, desto höher ist die Bindungswahrscheinlichkeit.

Mit Hilfe dieser Programme wurden mögliche Epitope aus den HHV-6B-Proteinen U11, U54 und U89/90 mit unterschiedlichen HLA-Restriktionen vorselektiert. Aus diesen Peptiden wurden dann nur diejenigen als Epitopkandidaten ausgewählt, welche im Vergleich zu bekannten T-Zellepitopen konservierte Ankerreste für die Bindung an das entsprechende HLA-Molekül aufwiesen. So wurden beispielsweise nur HLA-B8-Epitopkandidaten ausgewählt, deren Aminosäuresequenz an Position 3 Lysin oder Arginin und an Position 5 Lysin enthielt.

In Tabelle 5-IV sind die ausgewählten Peptide aus dem HHV-6B-Virusstamm Z29 und außerdem die homologen Peptidsequenzen aus einem weiteren HHV-6B-Stamm (HST) und einem HHV-6A-Stamm (U1102) aufgeführt.

5.2.2 Etablierung eines Stimulationsprotokolls für die Anreicherung von HHV-6-spezifischen T-Zellen

Erste *ex vivo* Analysen zum Überblick über die Häufigkeit HHV-6-spezifischer T-Zellen:

In ersten Experimenten habe ich überprüft, ob HHV-6-spezifische Gedächtnis-T-Zellen, die die ausgewählten Peptide (Tabelle 5-IV) erkennen, im Blut gesunder HHV-6-Virusträger nachweisbar sind. Dazu wurden PBMCs aus dem Blut isoliert und in getrennten Ansätzen über Nacht mit je einem der 30 HHV-6-Peptiden beladen. Zum Nachweis der dadurch aktivierten, IFN- γ -sezernierenden Zellen wurde ein IFN- γ -ELISpot-Test durchgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis ist unter Abbildung 5-22 gezeigt.

In diesem Fall wurden primäre T-Zellen des HHV-6-positiven Spenders JG (HLA-Typ siehe Tabelle 3-I, Seite 21) auf Vorhandensein HHV-6-spezifischer T-Zellen überprüft. Zum Vergleich wurden EBV- bzw. CMV-spezifische Zellen durch Beladung der PBMCs mit den entsprechenden, zum HLA-Typ des Spenders passenden Peptiden aktiviert. Es ist ein deutlicher Anteil an CMV pp65-reaktiven T-Zellen nachweisbar, von denen einige die Peptide NLV (HLA-A2-restringiert) und FPT (HLA-B35-restringiert) erkennen. Innerhalb der 200.000 PBMCs/Well ist allerdings keine spezifische Reaktivität gegenüber EBV- und HHV-6-Peptiden nachweisbar, wenn man annimmt, dass bei der Analyse ein Hintergrundsignal von etwa 100 IFN- γ -sezernierenden Zellen pro Ansatz vorhanden ist. Bei Untersuchungen von T-Zellen anderer HHV-6-positiver Spender wurde ein

ähnliches Ergebnis erzielt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Anteil an HHV-6-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen im Blut sehr niedrig ist.

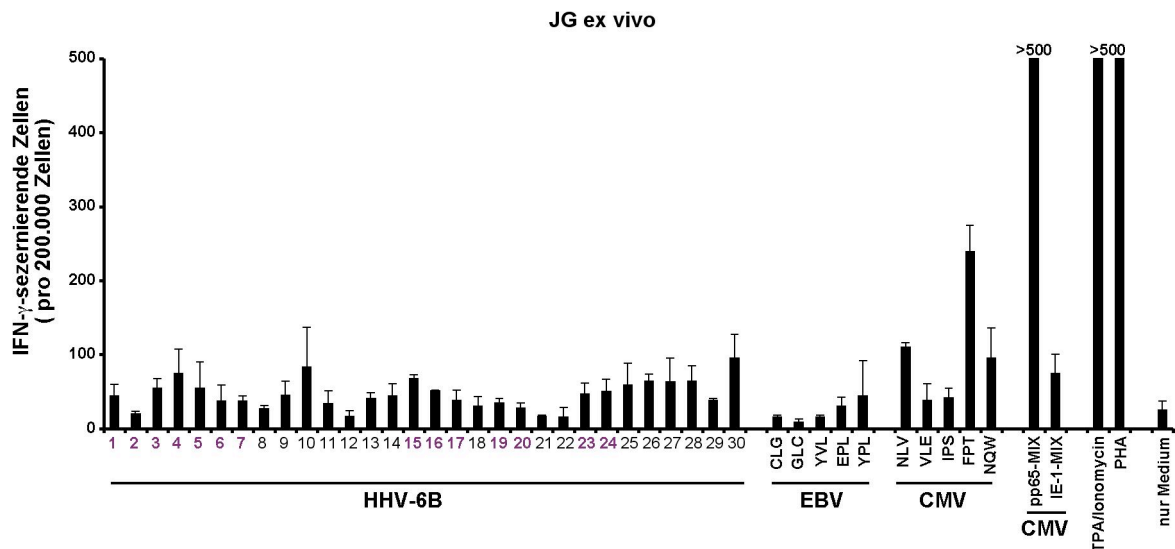


Abbildung 5-22: Ex vivo Stimulation primärer T-Zellen eines HHV-6-positiven Spenders mit HHV-6B-Peptiden. PBMCs des Spenders JG (HHV-6/CMV/EBV-positiv) wurden über Nacht mit den HHV-6-Peptiden und zum Vergleich mit EBV- bzw. CMV-Peptiden beladen. Die Anzahl an IFN- γ -sezernierenden Zellen wurde mittels ELISpot-Test analysiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit Medium behandelt, als Positivkontrolle dienten die pan-T-Zellaktivatoren TPA/Ionomycin und PHA. Es wurden folgende Peptide verwendet: HHV-6-Peptide Nr. 1 bis 30 (siehe Tabelle 5-IV, Seite 71), CLG (HLA-A2, EBV, LMP2), GLC (HLA-A2, EBV, BMLF1), YVL (HLA-A2, EBV, BRLF1), EPL (HLA-B35, EBV, BZLF1), YPL (HLA-B35, EBV, EBNA3A), NLV (HLA-A2, CMV, pp65), VLE (HLA-A2, CMV, IE-1), IPS (HLA-B35, CMV, pp65), FPT (HLA-B*3502, CMV, pp65), NQW (HLA-B35, CMV, pp65), pp65-Mix (Mischung aus verschiedenen pp65-Epitopen), IE-1-Mix (Mischung aus verschiedenen IE-1-Epitopen). Die zum HLA-Typ des Spenders passenden HHV-6-Peptide sind farbig gekennzeichnet.

Erste Versuche zur Anreicherung HHV-6-spezifischer T-Zellen und Nachweis einer ersten HHV-6-Peptidspezifität:

Um HHV-6-spezifische T-Zellen dennoch *in vitro* nachweisen zu können, ist also eine Anreicherung der virusspezifischen T-Zellen innerhalb der primären T-Zellen notwendig. Da optimale Stimulationsbedingungen zur Anreicherung HHV-6-spezifischer T-Zellen nicht bekannt sind, habe ich zunächst Stimulationsbedingungen gewählt, die sich in unserem Labor für die Anreicherung von seltenen T-Zellspezifitäten bzw. für die Anreicherung von den relativ häufigen CMV-spezifischen T-Zellen bewährt hatten.

Caroline Zentz hatte für die Anreicherung von HPV-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen frisch isolierte PBMCs von HPV-positiven Spendern anfänglich mit HPV-Peptid beladen und in den ersten 21 Tagen mit den Zytokinen IL-12 und IL-7 kultiviert (Zentz et al., 2007). Ab Tag 21 waren die T-Zellkulturen wöchentlich mit autologen, HPV-peptidbeladenen CD40-aktivierten B-Blasten restimuliert und mit dem für die Proliferation von T-Zellen wichtigen Zytokin IL-2 versetzt worden. IL-7 ist als positiv für die T-Zellhomöostase beschrieben worden (Boyman et al., 2007). IL-12 soll die Aktivierung von T_H2 -Zellen unterdrücken (Sartori et al., 1997). Insgesamt sollte durch die

Zugabe dieser Zytokine ein günstiges Milieu für die Anreicherung von seltenen T-Zellen des T_H1 -Typs geschaffen werden.

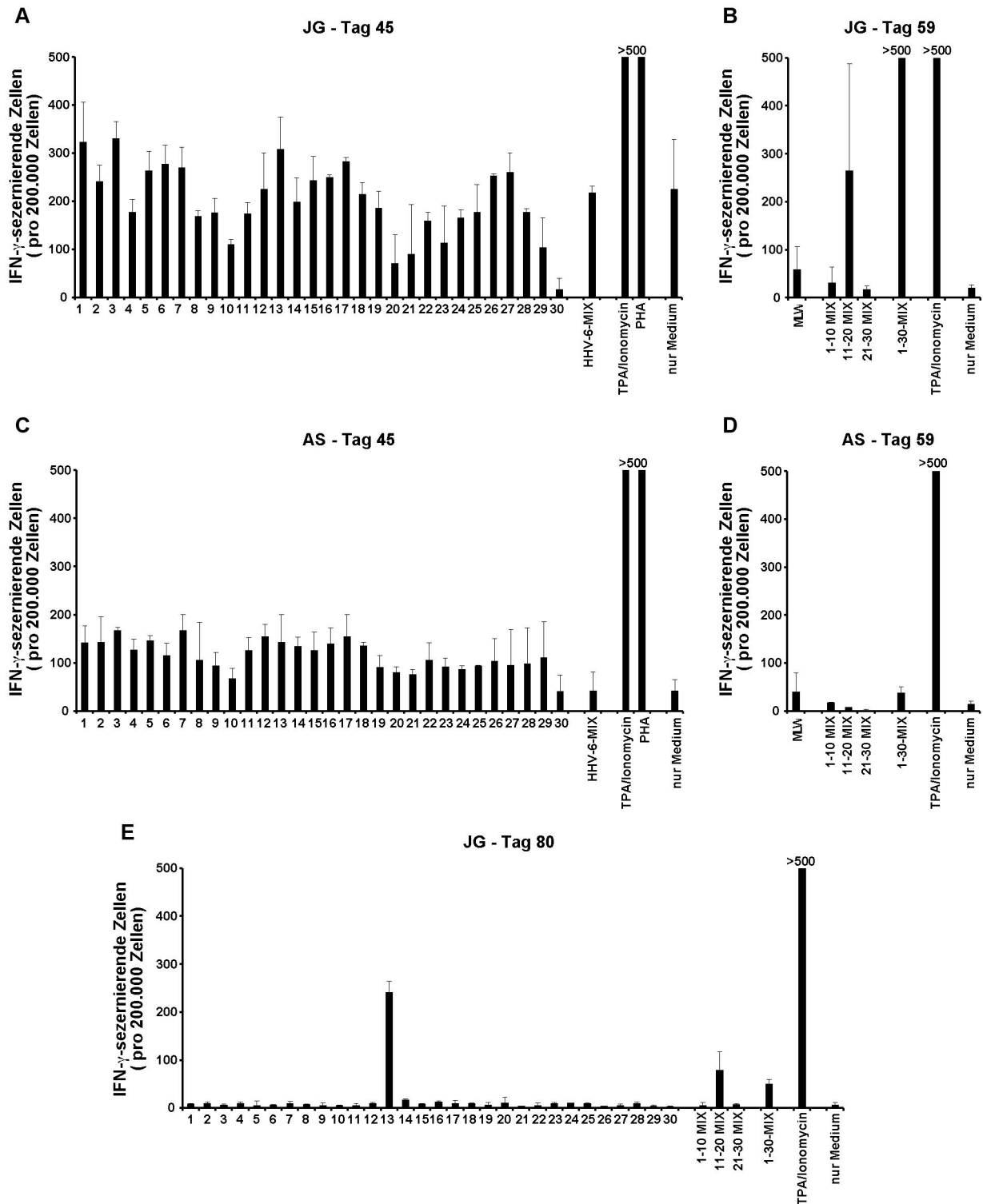


Abbildung 5-23: Quantifizierung der Anreicherung von IFN- γ -sezernierenden Zellen der Spender AS und JG nach Stimulation mit HHV-6-Peptiden. PBMCs der HHV-6-positiven Spender JG (A, B, E) und AS (C, D) wurden mit der Mischung aus den 30 vorhergesagten HHV-6-Peptiden (HHV-6-MIX bzw. 1-30-MIX stimuliert (HHV-6-Peptide siehe Tabelle 5-IV, Seite 71). Zu verschiedenen Zeitpunkten der Stimulation wurden die IFN- γ -sezernierenden Zellen innerhalb der T-Zelllinien mittels IFN- γ -ELISpot bestimmt. 1 bis 30, HHV-6-Peptid #1 bis #30; 1-10-MIX: Mischung aus den Peptiden #1 bis #10; 11-20-MIX: Mischung aus den Peptiden #11 bis #20; 21-30-MIX: Mischung aus den Peptiden #21 bis #30; HHV-6-MIX bzw. 1-30-MIX: Mischung aus den Peptiden #1 bis #30. Es sind die Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikaten gezeigt.

Angelehnt an dieses Protokoll habe ich die frisch aus dem Blut der HHV-6-positiven Spender AS und JG (HLA-Typen siehe Tabelle 3-I, Seite 21) isolierten T-Zellen anfänglich mit der Mischung aus den 30 HHV-6-Peptiden (HHV-6-MIX) beladen und für 25 Tage mit IL-12 und IL-7 kultiviert. Anschließend wurden die T-Zellen wöchentlich mit Hilfe autologer B-Blasten, die vorher mit HHV-6-MIX-beladenen worden waren, unter Zugabe von 100 U/ml IL-2 restimuliert. Durch den Einsatz von BBL, also autologen B-Zellen, die keine weiteren Virusantigene tragen, sollte erreicht werden, dass möglichst wenige T-Zellen mit anderer Spezifität mitstimuliert werden, da diese die Anreicherung der HHV-6-spezifischen T-Zellen behindern oder in deren Spezifitätsanalysen Hintergrundaktivitäten verursachen.

Die Reaktivität der HHV-6-peptidstimulierten T-Zelllinien wurde mittels IFN- γ -ELISpot-Tests zu verschiedenen Zeitpunkten des Stimulationsprozesses analysiert (Abbildung 5-23). Nach etwa eineinhalb Monaten Stimulation waren nach Kokultur mit autologen, HHV-6-peptidbeladenen B-Zellen höhere Zahlen IFN- γ -sezernierender T-Zellen nachweisbar (Abbildung 5-23, A und C). Allerdings war, vor allem bei der JG-T-Zelllinie, auch ein beträchtlicher Anteil an T-Zellen vorhanden, die die autologen Zielzellen auch ohne HHV-6-Peptid erkannten. Eine klare Aussage über die Reaktivität dieser Zellkulturen war also zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

Nach weiteren 14 Tagen Stimulation wurden die T-Zelllinien direkt mit Mischungen aus jeweils 10 HHV-6-Peptiden beladen und erneut auf die Erkennung dieser HHV-6-Peptide mittels IFN- γ -ELISpot getestet. Die T-Zellen, welche ja selbst HLA-Klasse-I-Moleküle tragen, sollten sich gegenseitig die Peptide präsentieren. Wegen der hohen Hintergrund-Reaktivität bei der ersten ELISpot-Analyse an Tag 45 (Abbildung 5-23, A und C) wurde auf die Zugabe von APCs verzichtet. Das Ergebnis ist in Abbildung 5-23B und D dargestellt. In der AS-T-Zelllinie waren keine HHV-6-peptidreaktiven Zellen nachweisbar, wohingegen innerhalb der JG-T-Zelllinie eine deutliche Reaktivität gegenüber der Mischung aus den Peptiden Nr. 11 bis 20 zu erkennen war. Nach einer weiteren Analyse an Tag 80, bei der wie an Tag 59 keine APCs bei der Über-Nacht-Stimulation zugegeben wurden, konnte eine deutliche Reaktivität der JG-T-Zellkultur gegen das Peptid-Nr. 13, welches als HLA-B7-restringiert vorhergesagt wurde, beobachtet werden (Abbildung 5-23E). Nachdem der Spender JG HLA-B7-negativ ist, ist unklar, ob es sich um eine Kreuzreaktivität einer nicht HHV-6-spezifischen T-Zellpopulation handelt oder ob dieses HHV-6-Peptid auch auf einem anderen HLA-Klasse I-Molekül präsentiert wird und so spezifisch von HHV-6-spezifischen T-Zellen erkannt werden kann. Leider waren detailliertere Untersuchungen dieser Reaktivität nicht möglich, da die T-Zelllinie nicht länger in Kultur aufrecht erhalten werden konnte.

Parallel wurden frisch isolierte PBMCs des Spenders AH nach dem für die Anreicherung von EBV- und CMV-spezifischen Zellen etablierten Protokoll (Wiesner et al., 2008) stimuliert. Dabei werden die Zellen an Tag 0 entweder mit den Peptiden direkt beladen oder es werden peptidbeladene CD40-aktivierte B-Zellen zur Stimulation verwendet. Bereits ab Tag 0 wird das Zytokin IL-2 in geringen Mengen zugesetzt, um die virusspezifischen T-Zellen schnell zur Proliferation zu bringen.

Ab Tag 10-14 werden die T-Zellen mit Hilfe von autologen, peptidbeladenen B-Blasten nun wöchentlich restimuliert, solange bis die gewünschte Anreicherung erfolgt ist. Die IL-2-Konzentration wird im Laufe der Stimulationsprozedur sukzessive erhöht.

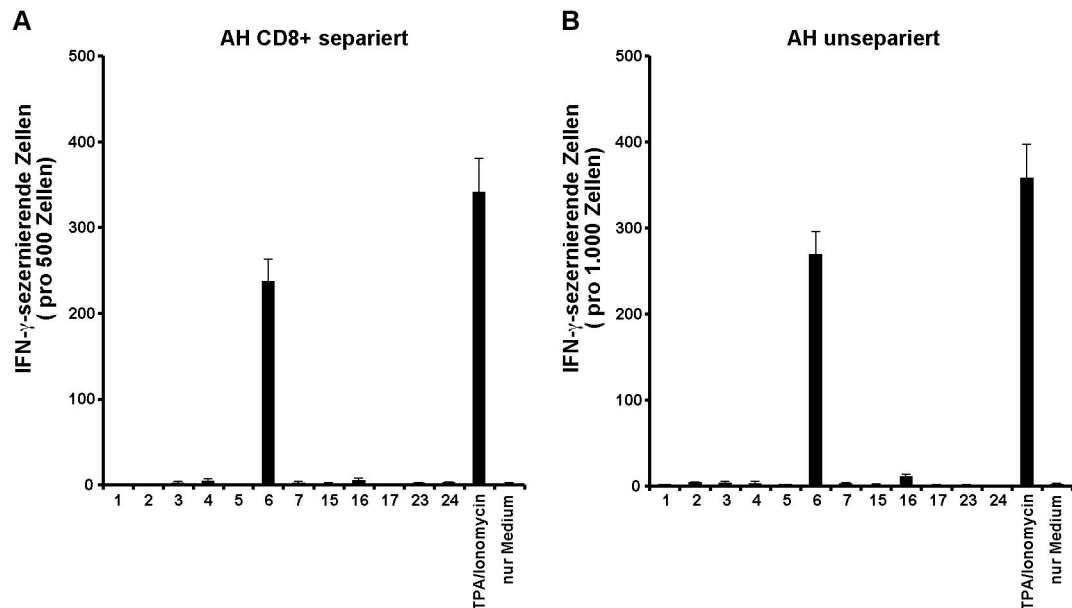


Abbildung 5-24: Quantifizierung der Anreicherung von IFN-γ-sezernierenden Zellen des Spenders AH nach Stimulation mit HHV-6-Peptiden. PBMCs des HHV-6-positiven Spenders AH wurden mit der Mischung aus den 30 vorhergesagten HHV-6-Peptiden (HHV-6-MIX, Peptide siehe Tabelle 5-IV, Seite 71) stimuliert. An Tag 63 der Stimulation wurde die Anzahl IFN-γ-sezernierender Zellen nach Über-Nacht-Stimulation mit den als HLA-A2-restringiert vorhergesagten Peptiden mittels IFN-γ-ELISpot bestimmt. Zahlen in der Legende stehen für die entsprechende HHV-6-Peptidnummer. Es sind die Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikaten gezeigt.

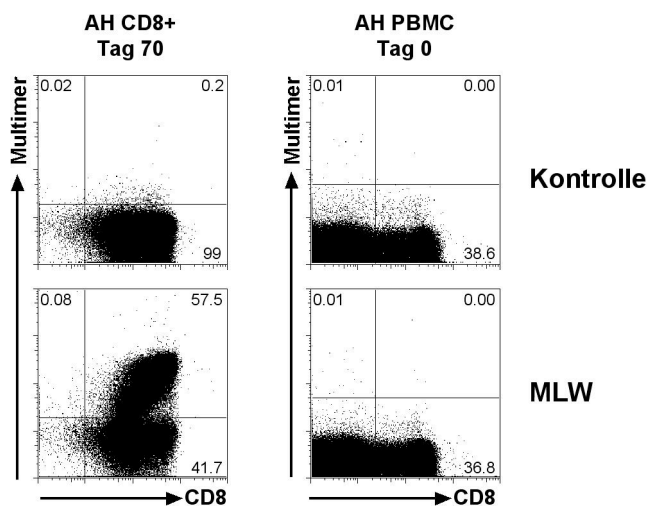


Abbildung 5-25: Anreicherung von HHV-6-spezifischen T-Zellen des Spenders AH durch Stimulation mit HHV-6-peptidbeladenen B-Blasten. Die Häufigkeit an CD8⁺ T-Zellen, die das HHV-6-Peptid MLW spezifisch erkennen, wurde durch Färbung mit MLW-Pentamer und anti-CD8-Antikörper an Tag 0 und Tag 70 nach Stimulation von PBMCs des Spenders AH mit autologen, mit HHV-6-Peptidmix beladenen B-Zellen bestimmt. Die Zellen wurden in den ersten 14 Tagen ohne Zytokine, ab Tag 14 unter Zugabe von IL-2 kultiviert. Als Kontrolle wurde die Färbeprozedur ohne Zugabe des Pentamers durchgeführt. Die Zahlen geben % im Quadrant an.

In den ersten zwei Monaten der Stimulationsperiode war keine Anreicherung von HHV-6-spezifischen T-Zellen zu beobachten. An Tag 36 wurden die CD8⁺ Zellen aus der T-Zellkultur isoliert und separat weiterkultiviert, da die CD4⁺ Zellen stärker proliferierten und begannen, die T-Zellkultur zu dominieren. Nach 63 Tagen war zum ersten Mal ein deutlicher Anteil an gegen das HHV-6-Peptid Nr. 6 (MLW) reaktiven T-Zellen im IFN-γ-ELISpot detektierbar (Abbildung 5-24). Mittels des daraufhin erworbenen MLW/HLA-A2-Pentamers konnte dieser Anteil als MLW-pentamerbindend bestätigt und genauer quantifiziert werden. Etwa 58% der Zellen innerhalb der

CD8-separierten AH-T-Zelllinie waren $CD8^+/MLW^+$ (Abbildung 5-25). Innerhalb der frisch isolierten PBMCs waren keine MLW-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen detektierbar, was, wie auch schon die *ex vivo* ELISpot-Analysen, darauf hin deutet, dass diese HHV-6-peptidspezifischen Zellen im Blut gesunder HHV-6-Virusträger relativ selten sind. Bei der Analyse mittels IFN- γ -ELISpot an Tag 63 war außerdem ein kleiner Anteil gegen das HHV-6-Peptid Nr. 16 (ILY) reaktiver Zellen zu beobachten (Abbildung 5-24).

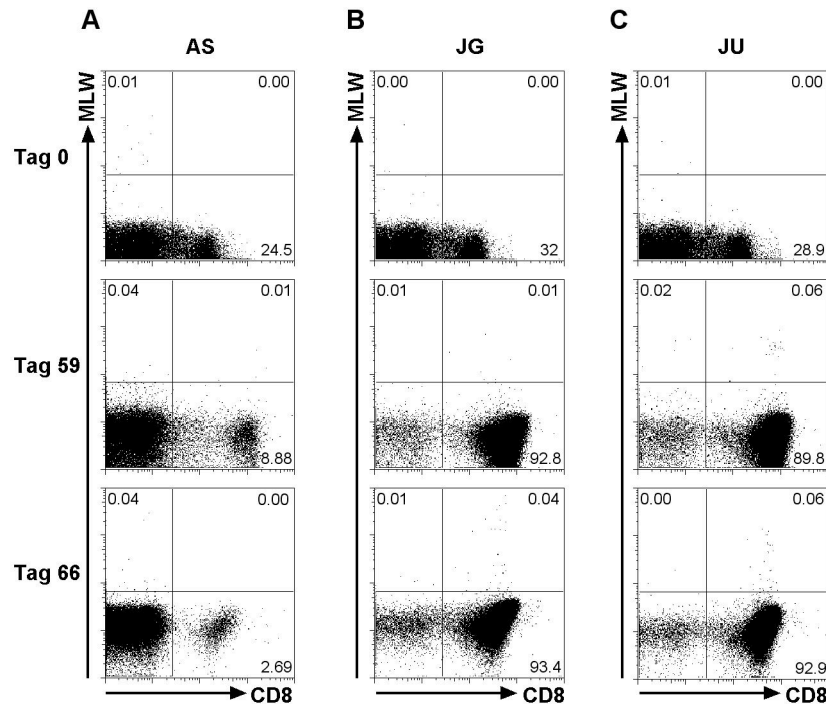


Abbildung 5-26: Anreicherung von HHV-6-spezifischen T-Zellen der Spender AS, JG und JU durch Stimulation mit HHV-6-peptidbeladenen B-Blasten. Die Häufigkeit an $CD8^+$ T-Zellen, die das HHV-6-Peptid MLW spezifisch erkennen, wurde durch Färbung mit MLW-Pentamer und anti- $CD8$ -Antikörper an Tag 0, Tag 59 und Tag 66 nach Stimulation von PBMCs der Spender AS (A), JG (B) und JU (C) mit autologen, mit HHV-6-Peptidmix beladenen B-Zellen bestimmt. In den ersten 25 Tagen wurden die T-Zellen in Anwesenheit der Zytokine IL-7 und IL-12 kultiviert. Erst ab Tag 25 wurde IL-2 zugesetzt. Die Zahlen geben % im Quadrant an.

Mit Hilfe des MLW-Pentamers wurden retrospektiv die T-Zelllinien der ebenfalls HLA-A2-positiven Spender AS und JG erneut analysiert (Abbildung 5-26, A und B). Es waren keine MLW-spezifischen Zellen innerhalb der unbehandelten PBMCs beider Spender (Tag 0) nachweisbar. Bei Spender AS war außerdem keine Anreicherung MLW-spezifischer Zellen detektierbar (Abbildung 5-26A), bei Spender JG hingegen kam es im Verlauf der Stimulation zu einer schwachen Anreicherung MLW-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen (Abbildung 5-26B). Auch bei einem dritten HLA-A2-positiven Spender (JU), dessen Zellen analog zu den T-Zelllinien von AS und JG behandelt wurden, konnte eine schwache Anreicherung von MLW-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 5-26C). Die Zellkulturen der Spender JG und JU waren an Tag 66 dominiert von $CD8^+$ T-Zellen, die AS-Zellkultur war dominiert von $CD4^+$ T-Zellen, was zusätzlich zu den bisherigen Beobachtungen auf ein unspezifisches Wachstum der T-Zellen dieses Spenders hinweist.

In den bisherigen Experimenten hat sich damit gezeigt, dass T-Zellen, welche spezifisch die vorhergesagten HHV-6-Epitope erkennen, entweder im T-Zellgedächtnis gesunder HHV-6-positiver Spender nicht vorhanden oder sehr selten sind. Für MLW-spezifische T-Zellen zeigte ich, dass die Anreicherung dieser Zellen *in vitro* im Prinzip möglich, aber bei verschiedenen Spendern und Protokollen unterschiedlich effizient ist.

Evaluation verschiedener Stimulationsbedingungen zur Anreicherung von MLW-spezifischen T-Zellen:

Da jetzt bekannt war, dass MLW-spezifische Zellen im Blut gesunder Virusträger prinzipiell vorhanden sind, habe ich verschiedene Stimulationsmethoden für die Anreicherung von MLW-spezifischen T-Zellen evaluiert. Es sollte dadurch ein Stimulationsprotokoll etabliert werden, das für die effiziente Anreicherung von HHV-6-spezifischen T-Zellen optimiert ist und mit Hilfe dessen sich vielleicht auch noch HHV-6-spezifische T-Zellen nachweisen lassen, die andere HHV-6-Peptide erkennen. Außerdem sollte, wenn möglich, die Stimulationszeit verkürzt werden. Die angereicherten MLW-spezifischen T-Zellen sollten so noch ausreichend Proliferationskapazität behalten, um eine Herstellung von HHV-6-spezifischen T-Zellklonen und damit eine Charakterisierung der HHV-6-spezifischen Reaktivität auf klonaler Ebene zu ermöglichen.

Die Hauptprobleme bei den bisherigen Stimulationen waren, dass (1) die T-Zellkulturen von unspezifisch proliferierenden $CD4^+$ T-Zellen dominiert wurden oder (2) zu wenige T-Zellen überhaupt proliferierten, so dass es zu einem frühzeitigen Absterben der T-Zellkulturen kam. Es war zudem nicht klar, welches Zytokinmilieu sich am positivsten auf die Proliferation der HHV-6-spezifischen T-Zellen auswirkt, ohne T-Zellen anderer Spezifität zu induzieren, die das Wachstum der spezifischen T-Zellen einschränken könnten (regulatorische oder T_H2 -T-Zellen, unspezifisch wachsende $CD4^+$ T-Zellen). Um ein vorteilhaftes Milieu in der Zellkultur zu schaffen, wurden deshalb in den ersten Wochen der Stimulationsprozedur EBV- bzw. CMV-spezifische $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen kostimuliert. Dies sollte dazu führen, dass vor allem in der frühen Phase, in der der Anteil an HHV-6-spezifischen Zellen in der Kultur noch sehr gering ist, eine antigenspezifische Proliferation von T-Zellen des T_C1/T_H1 -Typs stattfindet. EBV- und CMV-spezifische Zellen sind im T-Zellgedächtnis seropositiver Spender häufig, und diese kostimulierten T-Zellen sollten in den ersten Tagen durch die von ihnen nach der Aktivierung produzierten Zytokine, wie z.B. IL-2, IFN- γ , TNF- α und GM-CSF, das Zytokinmilieu in der Zellkultur optimieren und die Proliferation der HHV-6-spezifischen T-Zellen verbessern oder störende Zellen unterdrücken. IL-2 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für T-Zellen im Allgemeinen. Setzt man der Zellkultur IL-2 schon sehr früh zu, in einer Phase, wo die T-Zellen noch keinen Kontakt zu ihrem Antigen hatten, könnte es zu einer antigenunabhängigen Vermehrung von T-Zellen kommen. Andererseits könnte sich die Anwesenheit von IL-2 bereits kurz nach der antigenspezifischen Aktivierung der T-Zellen vorteilhaft auf die Proliferation und damit die Anreicherung von antigenspezifischen T-Zellen auswirken. Die Anwesenheit der für die T-Zellhomöostase und die Unterdrückung von T_H2 -Zellen

wichtigen Zytokine IL-7 und IL-12 in den ersten Tagen der Kultur könnte sich positiv auf das Überleben der T-Zellen bis zum Antigenkontakt auswirken, und dadurch positiv zur späteren Anreicherung durch Proliferation nach Antigenkontakt beitragen. Diese Überlegungen wurden bei der Auswahl der unter Tabelle 5-V zusammengestellten Stimulationsbedingungen berücksichtigt.

Tabelle 5-V: Vergleich verschiedener Stimulationsbedingungen für die Anreicherung von MLW-spezifischen T-Zellen des Spenders AH

Grundbedingungen	Zelllinie	Hilfspeptide (EBV) (jeweils 1 µg/mL, bis Tag 21)	Zytokine (Tag 0-14)	CD8 ⁺ MLW ⁺ Zellen (Tag 63)
	AH-1	ohne	25 U/ml IL-2	0,047%
• Stimulation mit MLW (1 µg/ml) (an Tag 0 ohne APC)	AH-2	ohne	ohne	Zellen gestorben
• Restimulation ab Tag 14 mit MLW- beladenen (1 µg/ml) autologen BBL (Effektor:Stimulatorverhältnis 4:1)	AH-3	ohne	2,5 ng/ml IL-7 0,1 ng/ml IL-12	Zellen gestorben
• IL-2: an Tag 14 25 U/ml an Tag 21 50 U/ml ab Tag 28 100 U/ml	AH-4	YVL (HLA-A2, BRLF1) TDAW (HLA-DR15, BNRF1) PYYV (HLA-DR4, BHRF1)	ohne	49,7%
• Kultivierung in 24-Well Zellkulturplatten				
• Expansion der Zellkulturen angepasst an die Proliferation der Zellen	AH-5	YVL (HLA-A2, BRLF1) TDAW (HLA-DR15, BNRF1) PYYV (HLA-DR4, BHRF1)	25 U/ml IL-2	2,49%

Ich habe also PBMCs des Spenders AH anfänglich mit dem HHV-6-Peptid MLW und in manchen Fällen zusätzlich mit den von mir so genannten "Hilfspeptiden" – hier jeweils zum HLA-Typ des Spenders passende CD8- und CD4-T-Zellepitope aus EBV oder CMV – beladen und unterschiedliche Zytokinbedingungen für die Stimulation von HHV-6-spezifischen T-Zellen getestet.

Der Wachstumsverlauf der unterschiedlich stimulierten T-Zellkulturen ist unter Abbildung 5-27 gezeigt. Insgesamt kam es in den ersten Wochen der *in vitro*-Kultur mit allen Stimulationsprotokollen zur Abnahme der Gesamtzellzahl. An Tag 28 wurde eine Aufreinigung der T-Zelllinien über einen Ficoll-Gradienten durchgeführt, um die in der Kultur enthaltenen toten Zellen abzutrennen. Nach dieser Prozedur kam es zur Proliferation der Gesamtkulturen. Von den T-Zellkulturen, die ohne EBV-Hilfspeptide stimuliert wurden, konnte nur die Linie AH-1, welche bereits ab Tag 0 mit IL-2 versetzt wurde, länger als bis Tag 42 aufrechterhalten werden (Abbildung 5-27A). Beide mit EBV-Hilfspeptiden kostimulierten Linien (AH-4 und AH-5) konnten ebenfalls aufrecht erhalten werden (Abbildung 5-27B). Das Wachstum dieser beiden T-Zellkulturen stagnierte nach etwa 50 Tagen *in vitro*-Stimulation und war vergleichbar mit der T-Zelllinie AH-1.

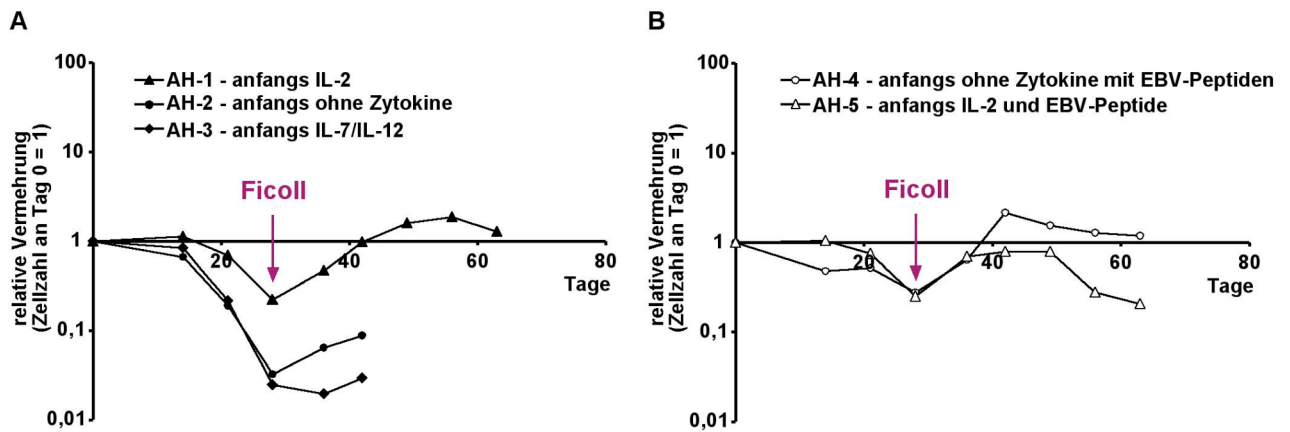


Abbildung 5-27: Wachstumsverlauf der unterschiedlich stimulierten T-Zelllinien des Spenders AH. Die Gesamtzellzahl der T-Zellkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Stimulationsverlaufs wurde durch Zählen lebender Zellen nach Trypanblau-Färbung bestimmt. Die Zellzahl an Tag 0 wurde gleich eins gesetzt.

Die Anreicherung MLW-spezifischer T-Zellen sowie der in manchen Fällen kostimulierten YVL-spezifischen Zellen wurden mittels Färbung mit den entsprechenden Peptid/HLA -Multimeren analysiert (Abbildung 5-28). In der Linie AH-1 kam es bis Tag 63 zu keiner Anreicherung von MLW-spezifischen Zellen (Abbildung 5-28A). Nachdem zur Stimulation kein YVL-Peptid zugesetzt wurde, kam es erwartungsgemäß auch nicht zur Anreicherung von YVL-spezifischen T-Zellen. Innerhalb der Zellkulturen AH-4 und AH-5, die bis Tag 21 zusätzlich mit den EBV-Hilfspeptiden stimuliert worden sind, kam es zu einer deutlichen Anreicherung MLW-spezifischer Zellen (Abbildung 5-28, B und C). Bis zum Tag 36 wurden auch YVL-spezifische T-Zellen angereichert. Anschließend nahm der Anteil EBV-spezifischer Zellen allerdings wieder ab, weil die Stimulation mit EBV-Hilfspeptiden ab Tag 28 abgesetzt wurde. Insgesamt war die Anreicherung HHV-6- wie auch EBV-spezifischer T-Zellen bei Linie AH-4 besser. Dies bedeutet, dass die Zugabe von IL-2 erst ab Tag 14 sich positiv auf die selektive Proliferation von antigenspezifisch stimulierten T-Zellen auswirkt. Auch das Ergebnis der vergleichenden Stimulation ohne EBV-Hilfspeptide der Linien AH-1, AH-2 und AH-3 bestätigt dies (Abbildung 5-27A und Abbildung 5-28A). Die wenigen in diesen T-Zellkulturen aktivierten MLW-spezifischen T-Zellen reichten nicht aus, um ein günstiges Zytokinmilieu zu schaffen. Ohne die Zugabe von IL-2 konnten also nicht ausreichend T-Zellen proliferieren, um die Gesamtkultur zu erhalten. Gibt man IL-2 allerdings bereits an Tag 0 zu, so proliferieren so viele T-Zellen unspezifisch, dass die Erhöhung des Anteils an HHV-6-spezifischen T-Zellen verhindert wird. Die Zellkultur kann so jedoch aufrecht erhalten werden.

Um eine Selektion HHV-6-spezifischer Zellen unter Erhalt der *in vitro*-Kultur zu erreichen, müssen also von Stimulationsbeginn an ausreichend T-Zellen antigenspezifisch aktiviert werden. Dies kann durch Mitstimulation von T-Zellen mit bekannter Spezifität, wie z.B. EBV oder CMV, erreicht werden. Ein Überwuchern der T-Zellkultur durch diese mitstimulierten T-Zellen kann man allerdings leicht vermeiden, indem man den antigenspezifischen Stimulus nach den ersten Stimulationsrunden weglässt.

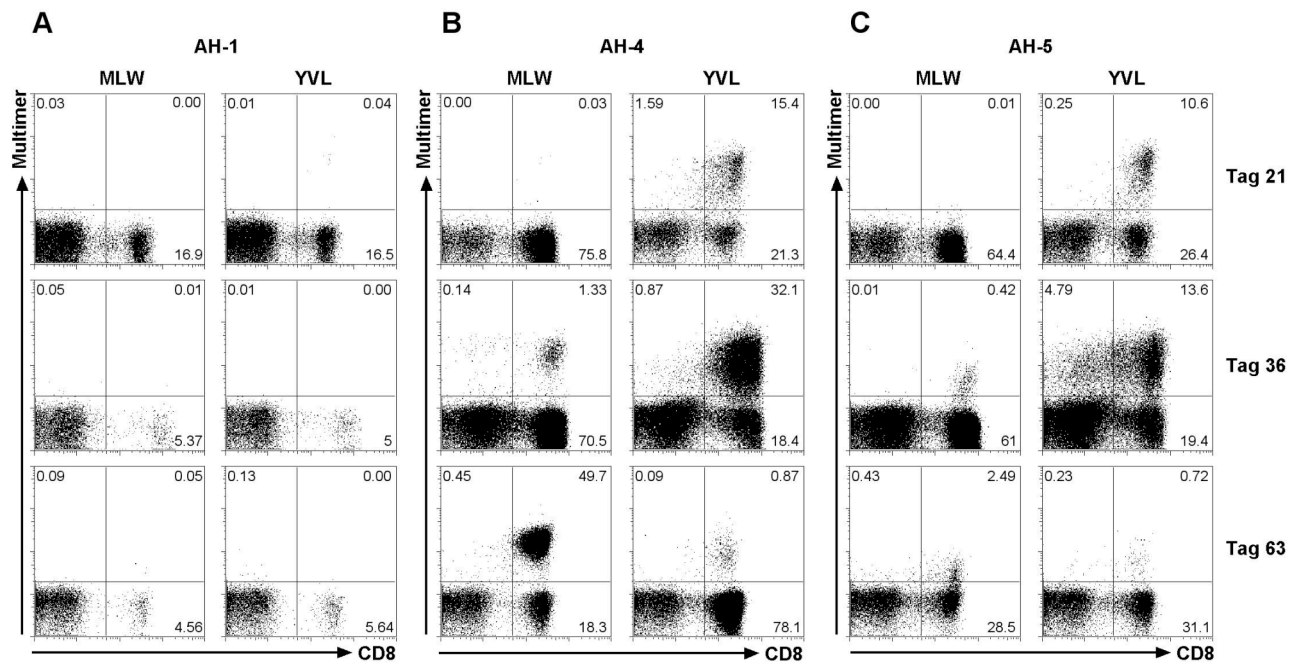


Abbildung 5-28: Evaluation unterschiedlicher Stimulationsbedingungen für die Anreicherung von HHV-6-spezifischen T-Zellen. PBMC des HHV-6-positiven Spenders AH wurden mit MLW-Peptid unter verschiedenen Bedingungen stimuliert. Die unterschiedlichen Stimulationsprotokolle sind unter Tabelle 5-V zusammengefasst. An Tag 21, 36 und 63 wurde die Häufigkeit an MLW-spezifischen CD8⁺ T-Zellen innerhalb der T-Zelllinien AH-1 (A), AH-4 (B) und AH-5 (C) durch Färbung mit MLW-Pentamer und anti-CD8-Antikörper analysiert. Mittels Färbung mit YVL-Pentamer und anti-CD8-Antikörper wurde der Anteil an kostimulierten YVL-spezifischen T-Zellen bestimmt.

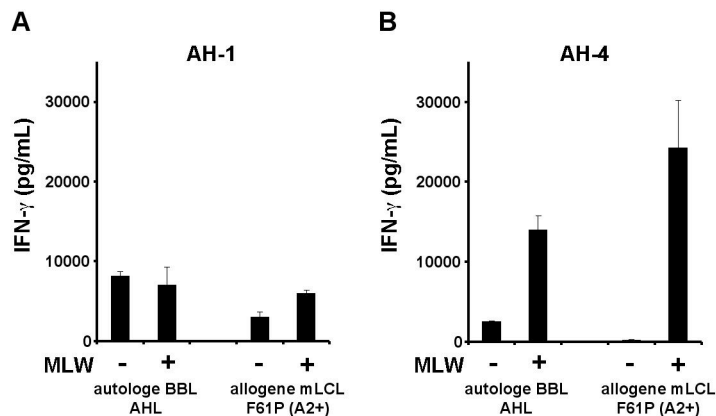


Abbildung 5-29: MLW-spezifische IFN-γ-Sekretion der polyklonalen HHV-6-T-Zelllinien des Spenders AH. PBMCs des HHV-6-positiven Spenders AH wurden (A) entweder nur mit MLW-Peptid (AH-1) oder (B) zusätzlich mit EBV-Hilfspeptiden (AH-4) nach den unter Tabelle 5-V zusammengefassten Protokollen stimuliert. An Tag 63 wurden die polyklonalen T-Zelllinien mit autologen BBL und allogenen, HLA-A2-positiven mLCLs in An- oder Abwesenheit von MLW-Peptid kokultiviert und die Menge an sezerniertem IFN-γ mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikaten gezeigt.

An Tag 63 wurde die Reaktivität der polyklonalen MLW-spezifischen T-Zelllinien AH-1 und AH-4 hinsichtlich der Ausschüttung des T-Zelleffektorzytokins IFN-γ nach Kokultur mit MLW-peptidpräsentierenden Zellen getestet (Abbildung 5-29). Von der Linie AH-4 werden sowohl autologe CD40-aktivierte B-Zellen als auch allogene, HLA-A2-positive mLCLs spezifisch erkannt, wenn sie vorher mit MLW-Peptid beladen worden waren. Die autologen B-Blasten, die auch als Stimulatorzellen verwendet wurden, werden auch im unbeladenen Zustand erkannt, allerdings sehr viel schwächer. Dies deutet auf eine Koexpansion von T-Zellen hin, die in B-Blasten vielleicht überexprimierte Autoantigene erkennen. Die allogene, bezüglich HLA-Klasse-I nur in HLA-A2 und

HLA-Cw4 übereinstimmende mLCL des Spenders F61 wird ohne MLW-Peptid nicht erkannt. Die T-Zelllinie AH-1 erkennt die autologen B-Blasten und die allogene mLCL, unabhängig davon, ob die Zellen vor mit MLW-Peptid beladen worden waren. In dieser Linie sind also, wie bereits erwartet, hauptsächlich unspezifische T-Zellen vermehrt worden.

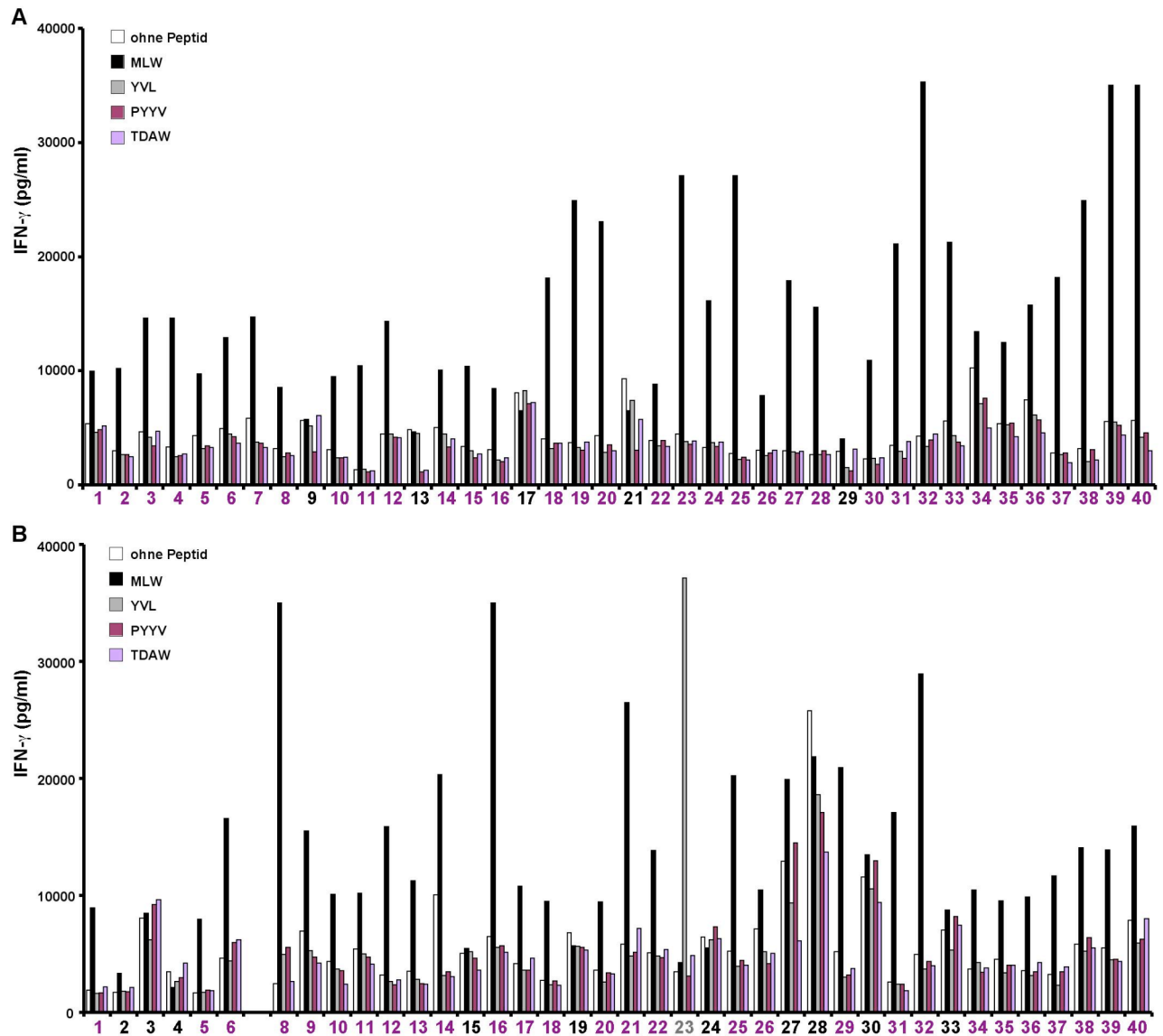


Abbildung 5-30: Reaktivitätsanalyse der aus der MLW-spezifischen T-Zelllinie AH-4 hergestellten T-Zellklone. Ein Teil der Zellkultur AH-4 des Spenders AH wurde für 6 Stunden mit MLW-Peptid stimuliert und die daraufhin IFN- γ -sezernierenden Zellen innerhalb der Kultur wurden an Tag 49 mittels magnetischer Separation isoliert und vereinzelt (A). Der restliche Teil der Zellkultur AH-4 wurde unsepariert in die Einzelzellklonierung eingesetzt (B). Die Reaktivität der entstandenen Einzelklone gegenüber der zur Stimulation eingesetzten Peptide MLW, YVL, TDAW und PYYV wurde mittels IFN- γ -ELISA analysiert. Die T-Zellklone mit deutlicher MLW-Reaktivität sind violett, der YVL-spezifische T-Zellklon grau markiert.

Nachdem bereits an Tag 36 MLW-spezifische T-Zellen in der T-Zelllinie AH-4 angereichert waren, wurden mittels Einzelzellklonierung T-Zellklone hergestellt. Dazu habe ich einen Teil der T-Zelllinie ohne Vorbehandlung nach dem Standardprotokoll durch limitierende Verdünnung kloniert. Zum Anderen habe ich vor der Einzelzellklonierung die nach Stimulation mit MLW-Peptid IFN- γ -sezernierenden Zellen mittels magnetischer Separation abgetrennt und diese Population vereinzelt. Die nach etwa drei Wochen in den Kulturplatten ausgewachsenen T-Zellklone wurden

auf ihre Reaktivität gegenüber dem HHV-6-Peptid MLW bzw. gegenüber den EBV-Hilfspeptiden YVL, TDAW und PYYV in einem IFN- γ -ELISA getestet (Abbildung 5-30).

Die T-Zellklonierung nach vorheriger Isolation der IFN- γ -positiven Zellen ergab 35 MLW-spezifische von 40 getesteten T-Zellklonen (Abbildung 5-30A). Die restlichen fünf T-Zellklone erkannten keines der zur Stimulation der Zellkulturen eingesetzten Peptide. Nach Einzelzellklonierung der unseparierten AH-4-T-Zelllinie waren 28 von 39 getesteten Klonen MLW-spezifisch, ein Klon war YVL-spezifisch und die restlichen 10 T-Zellklone erkannten keines der getesteten Peptide (Abbildung 5-30B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die in der AH-4-T-Zellkultur enthaltenen MLW-spezifischen T-Zellen ausreichend proliferatives Potential haben, um ausgehend von einer T-Zelle als monoklonale T-Zelllinie analysierbar zu werden. Darüber hinaus habe ich erwartungsgemäß eine höhere Anzahl MLW-spezifischer T-Zellklone erhalten, wenn vorher die auf den MLW-Peptid-Stimulus hin IFN- γ -sezernierenden Zellen abgetrennt wurden. Weiterhin konnte durch die Klonierung der unseparierten AH-4-T-Zelllinie gezeigt werden, dass die anfangs mitstimulierten EBV-spezifischen T-Zellen zum Zeitpunkt der Klonierung bereits deutlich im Unterschuss vorhanden waren, so dass nur ein YVL-spezifischer T-Zellklon hergestellt werden konnte. Der MLW-spezifische Klon Nr. 4 (AH-4 MLW) wurde im Folgenden noch weiter charakterisiert. Die Ergebnisse der Analyse sind in Kapitel 5.2.3 (ab Seite 89) zusammengefasst.

Anreicherung HHV-6-peptidspezifischer T-Zellen von weiteren gesunden HHV-6-positiven Spendern mit optimierten Stimulationsbedingungen:

Das optimierte Stimulationsprotokoll zur Anreicherung MLW-spezifischer T-Zellen habe ich nun für die Herstellung von HHV-6-spezifischen T-Zellen von weiteren gesunden Virusträgern verwendet. Zum Einen sollte dabei überprüft werden, ob MLW-spezifische T-Zellen wie bei Spender AH auch im T-Zellgedächtnis anderer HLA-A2-positiver Spender vorhanden sind, zum Anderen sollten, wenn möglich, noch weitere HHV-6-Epitopspezifitäten beschrieben werden.

PBMCs der HLA-A2-positiven Spender RZ, AS und JG wurden mit der Mischung aller als HLA-A2-restringiert vorhergesagten HHV-6-Peptide (HHV-6-A2-MIX) stimuliert. Da der Spender JG auch HLA-A35-positiv ist, wurden zusätzlich noch die als HLA-B35-restringiert vorhergesagten HHV-6-Peptide zugegeben (HHV-6-A2+B35-MIX). Die primären T-Zellen des HLA-A1- und HLA-B8-positiven Spenders MD wurden mit einer Mischung aus den Peptiden mit potentieller HLA-A1- bzw. HLA-B8-Restriktion stimuliert (HHV-6-A1+B8-MIX). Ich habe erneut den positiven Einfluss der gleichzeitigen Stimulation anderer virusspezifischer T-Zellen in der ersten Phase der *in vitro*-Kultur überprüft. Dazu wurde jeweils ein Teil der Zellen nur mit der entsprechenden HHV-6-Peptidmischung stimuliert, der andere Teil wurde zusätzlich noch mit zu den HLA-Typen der Spender passenden EBV- bzw. CMV-Peptiden stimuliert. In den ersten 14 Tagen der Stimulation wurde kein IL-2 zugesetzt. Die Stimulationsbedingungen sind in Tabelle 5-VI zusammengefasst.

Tabelle 5-VI: Stimulationsbedingungen für die Anreicherung von HHV-6-spezifischen T-Zellen der Spender AS, RZ und JG

Grundbedingungen	Zelllinie	Hilfspeptide (jeweils 1 µg/mL, bis Tag 21)	Zytokine (Tag 0-14)	CD8 ⁺ MLW ⁺ Zellen (Tag 61)
<ul style="list-style-type: none"> Stimulation mit: HHV-6-A2-MIX (AS, RZ) HHV-6-A2+B35-MIX (JG) HHV-6-A1+B8-MIX (MD) (1 µg/ml je Peptid) (an Tag 0 ohne APC) Restimulation ab Tag 14 mit HHV-6-Peptiden beladenen autologen BBL (Effektor:Stimulatorverhältnis 4:1) IL-2: an Tag 14 25 U/ml An Tag 21/28 50 U/ml ab Tag 35 100 U/ml Kultivierung in 24-Well Zellkulturplatten Expansion der Zellkulturen angepasst an die Proliferation der Zellen 	AS-1	YVL (HLA-A2, EBV, BRLF1) NEIF (HLA-DR8, EBV, BALF4)	ohne	3,65%
	AS-2	ohne	ohne	16,5% *
	RZ-1	YVL (HLA-A2, EBV, BRLF1) PYYV (HLA-DR4, EBV, BHRF1) TDAW (HLA-DR15, EBV, BNRF1)	ohne	57,1%
	RZ-2	ohne	ohne	3,27%
	JG-1	YVL (HLA-A2, EBV, BRLF1) KVYL (HLA-DR11, CMV, pp65)		0,055%
	MD-1	RAK (HLA-B8, EBV, BZLF1) KVYL (HLA-DR11, CMV, pp65)	ohne	—
	MD-2	ohne	ohne	—

* untypische Population von schwach multimerfärbenden Zellen an Tag 61 (vgl. Abbildung 5-32)

Bei den Spendern AS, RZ und MD war, nach anfänglichem Abnehmen der Zellzahl in den Kulturen, eine deutliche Proliferation der T-Zellen ab Tag 20 zu beobachten (Abbildung 5-31). Das Wachstum der mit bzw. ohne Hilfspeptide stimulierten Zellkulturen war im Gegensatz zu den Beobachtungen bei Spender AH (Abbildung 5-27, Seite 80) bei den hier analysierten Spendern vergleichbar. Da die T-Zelllinien dieser Spender AS und RZ generell recht viele CD4⁺ T-Zellen enthielten, besonders die Linien AS-2 und RZ-2, welche ohne Hilfspeptide stimuliert worden waren, habe ich an Tag 43 eine CD8-Separation durchgeführt und anschließend nur die CD8⁺ T-Zellen weiterkultiviert. Während des Stimulationsprozesses kam es in beiden Linien der Spender AS und RZ zur Anreicherung von MLW-spezifischen T-Zellen (Abbildung 5-32, A und B). Die Vermehrung war bei beiden Spendern effektiver, wenn zusätzlich EBV- und CMV-spezifische T-Zellen aktiviert wurden. An Tag 61 waren in den mit Hilfspeptiden kostimulierten Linien AS-1 und RZ-1 3,65% bzw. 57,1% MLW-spezifische T-Zellen nachweisbar. Damit war die Anreicherung von MLW-spezifischen T-Zellen in der Linie RZ-1 mit der T-Zellkultur AH-4 (Abbildung 5-28B, Seite 81) des Spenders AH vergleichbar, in der Linie AS-1 wurden dagegen weniger MLW-spezifische Zellen angereichert.

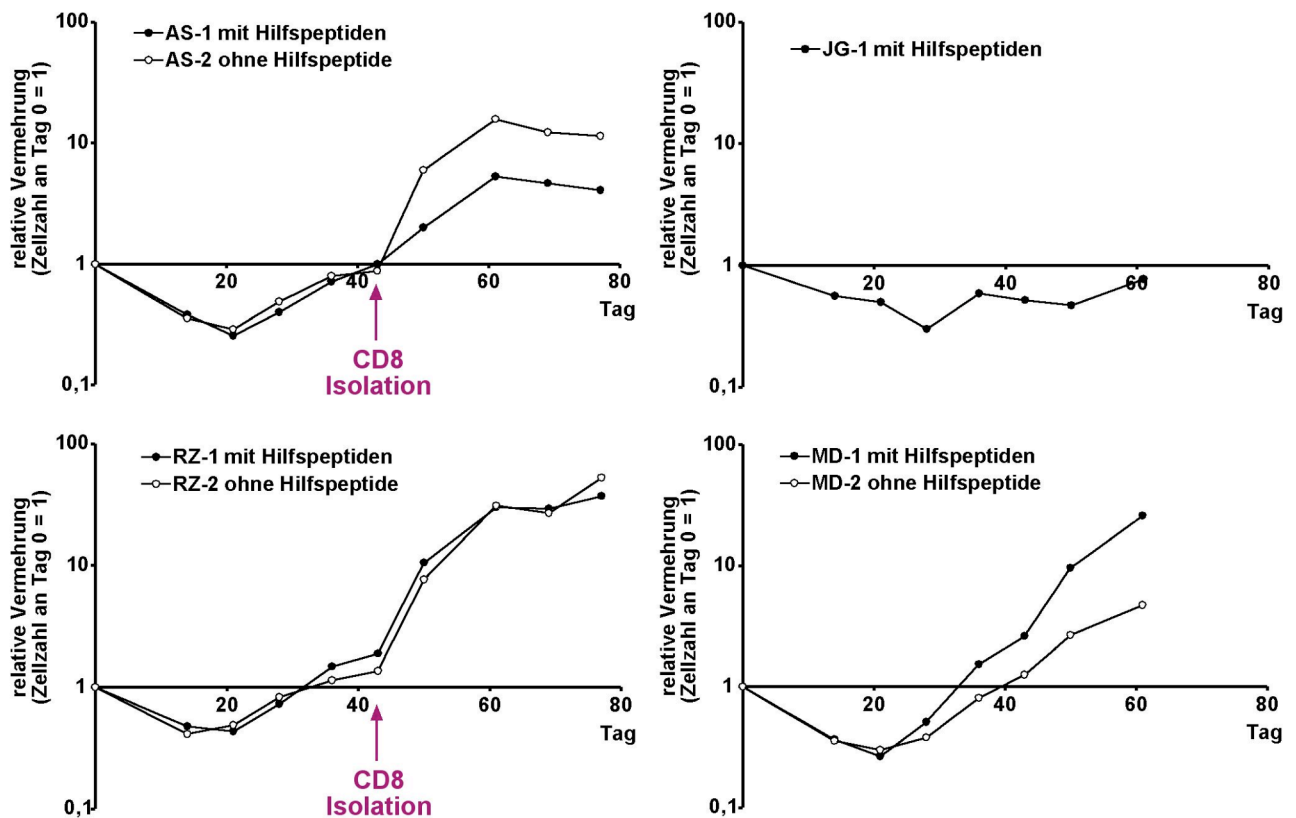


Abbildung 5-31: Wachstumsverlauf der HHV-6-peptidstimulierten T-Zelllinien der Spender AS, RZ, JG und MD. Die Gesamtzellzahl der T-Zellkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Stimulationsverlaufs wurde durch Zählen lebender Zellen nach Trypanblau-Färbung bestimmt. Die Zellzahl an Tag 0 wurde gleich eins gesetzt.

Die Wachstumskurven der Spender AS, RZ und MD sind recht ähnlich, während die Kurve der JG-1-T-Zelllinie deutlich abweicht (Abbildung 5-31). Diese mit HHV-6-A2+B35-MIX und zusätzlich mit Hilfspeptiden stimulierte T-Zelllinie proliferierte den gesamten Kulturzeitraum über nur schwach. Darüber hinaus war keine Anreicherung von MLW-spezifischen T-Zellen zu beobachten (Abbildung 5-32C). Letzteres deutet darauf hin, dass die MLW-Epitopspezifität innerhalb des Reaktivitätsspektrums HHV-6-spezifischer T-Zellen bei diesem Spender nicht vertreten ist oder zumindest eine untergeordnete Rolle spielt.

Um zu überprüfen, ob neben den teilweise in den Kulturen vorhandenen MLW-spezifischen T-Zellen noch andere HHV-6-spezifische T-Zellen vermehrt wurden, habe ich an Tag 50 des Stimulationsprozesses die Reaktivität der Kulturen gegenüber allogenen B-Zellen, die jeweils nur ein HHV-6-Peptid auf dem entsprechenden HLA-Molekül präsentierten, untersucht.

Bei beiden Zellkulturen der Spender AS und RZ waren zusätzlich zur MLW-spezifischen IFN- γ -Ausschüttung noch andere HHV-6-peptidspezifische Reaktivitäten zu beobachten (Abbildung 5-33, A und B), während die T-Zelllinien der Spender JG und MD keine HHV-6-spezifische IFN- γ -Sekretion zeigten (Abbildung 5-33, C und D). Die T-Zelllinie AS-1 erkennt die vier HHV-6-Peptide GIL, MLW, LLC und ILY deutlich, die Linie AS-2 reagiert nur auf die Peptide GIL und MLW (Abbildung 5-33A). Die Kostimulation von EBV-spezifischen T-Zellen hat bei Spender AS also zur Anreicherung eines breiteren Spektrums an HHV-6-peptidreaktiven T-Zellen geführt. Bei der

Stimulation primärer T-Zellen des Spenders RZ haben beide Protokolle zur Anreicherung von verschiedenen HHV-6-spezifischen T-Zellen geführt (Abbildung 5-33B). GIL-, MLW- und ILY-spezifische T-Zellen waren sowohl in der Linie RZ-1 als auch in der Linie RZ-2 nachweisbar, wohingegen SLM-reaktive Zellen nur in der Linie RZ-1, YLV- und YLG-reaktive T-Zellen nur in der Linie RZ-2 zu finden waren. Bei beiden Spendern waren somit spezifische T-Zellen für die Peptide GIL, MLW und ILY detektierbar.

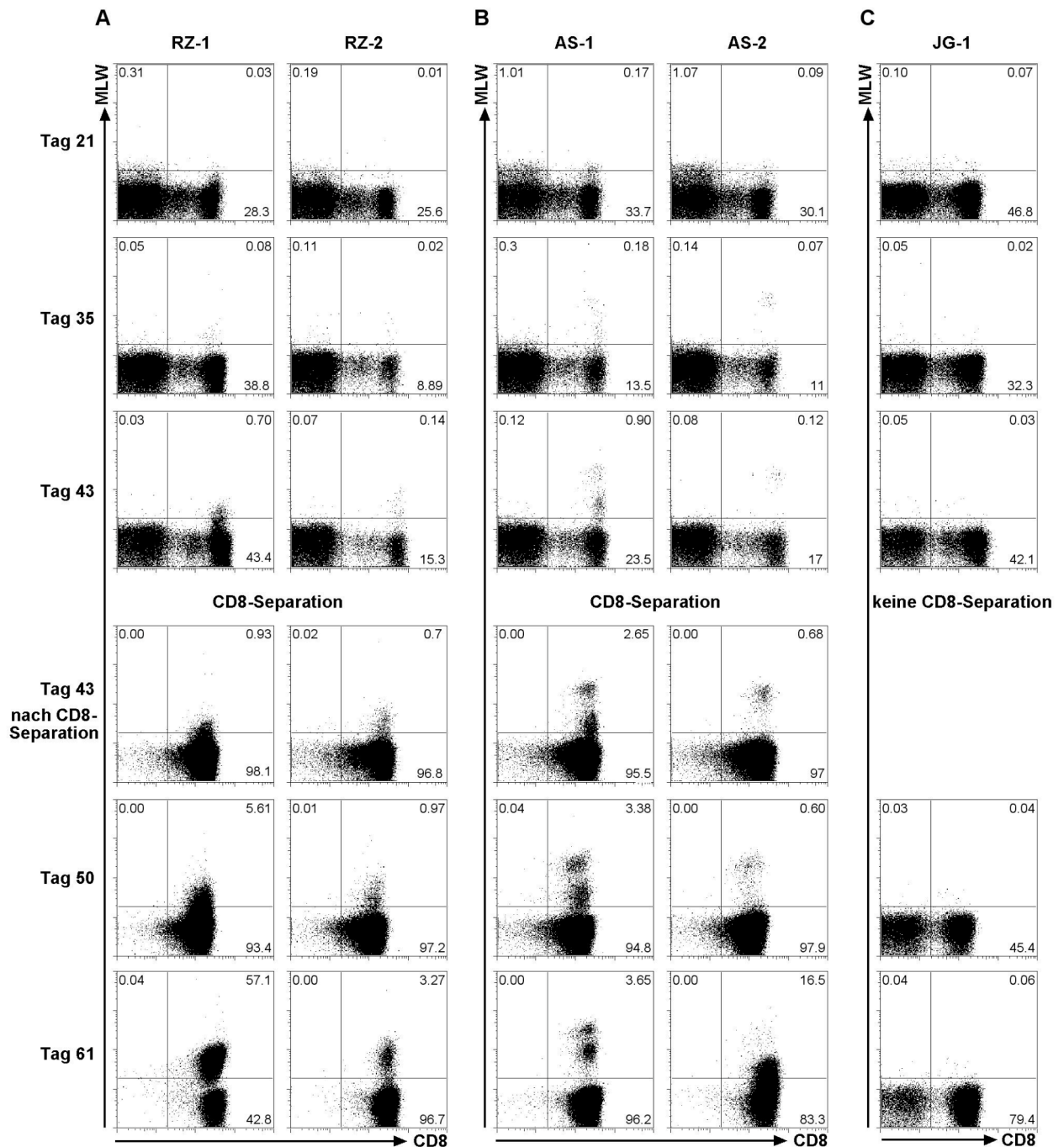


Abbildung 5-32: Anreicherung von HHV-6-spezifischen T-Zellen der Spender AS, RZ und JG durch Stimulation primärer T-Zellen. PBMCs der HHV-6-positiven Spender AS (A), RZ (B) und JG (C) wurden entweder nur mit zum HLA-Typ des Spenders passenden HHV-6-Peptiden (Kultur 1) oder zusätzlich mit Hilfspeptiden (Kultur 2) nach den unter Tabelle 5-VI zusammengefassten Bedingungen stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der *in vitro*-Kultur wurde die Häufigkeit an MLW-spezifischen CD8⁺ T-Zellen innerhalb der T-Zelllinien durch Färbung mit MLW-Pentamer und anti-CD8-Antikörper analysiert. An Tag 43 wurde bei den Linien der Spender AS und RZ eine CD8-Isolation durchgeführt.

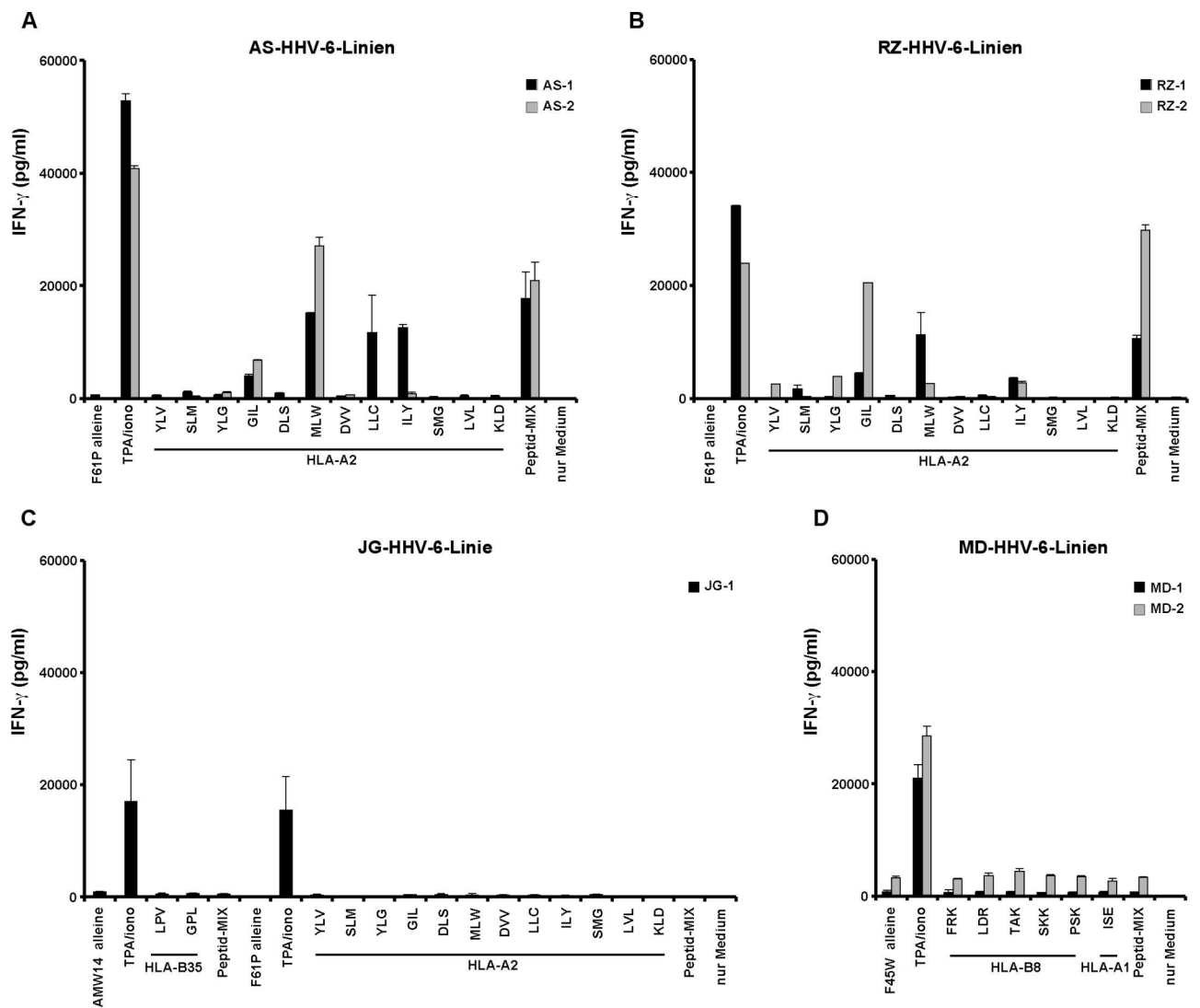


Abbildung 5-33: IFN- γ -Ausschüttung durch die HHV-6-peptidstimulierten Linien der Spender AS, RZ, JG und MD. PBMCs der HHV-6-positiven Spender AS (A), RZ (B), JG (C) und MD (D) wurden entweder nur mit zum HLA-Typ des Spenders passenden HHV-6-Peptiden (Kultur 1) oder zusätzlich mit Hilfspeptiden (Kultur 2) nach den unter Tabelle 5-VI zusammengefassten Bedingungen stimuliert. An Tag 50 wurden die polyklonalen T-Zelllinien mit allogenen mLCLs (F61P, HLA-A2+; AMW14, HLA-B35+; F45W, HLA-A1+/HLA-B8+) in An- oder Abwesenheit der jeweiligen, zur Stimulation eingesetzten HHV-6-Peptide kokultiviert und die Menge an sezerniertem IFN- γ mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikaten gezeigt. Die Peptide werden mit den ersten drei Buchstaben ihrer Aminosäuresequenz bezeichnet (Sequenzen siehe Tabelle 5-IV).

Nach Einzelzellklonierung der CD8-separierten T-Zelllinie AS-1 an Tag 43 habe ich unter 80 getesteten T-Zellklonen 3 GIL-spezifische, 7 MLW-spezifische, 18 LLC-spezifische und 6 ILY-spezifische Klone, also insgesamt 34 HHV-6-peptidspezifische T-Zellklone erhalten (Abbildung 5-34). Alle innerhalb der polyklonalen T-Zelllinie AS-1 detektierten Peptidspezifitäten (Abbildung 5-33A) konnten damit auch auf klonaler Ebene bestätigt werden und richteten sich gegen jeweils nur eines dieser Peptide. Je Peptidspezifität wurde ein T-Zellklon genauer charakterisiert (AS-62 GIL, AS-30 MLW, AS-6 LLC, AS-15 ILY). Die Ergebnisse der Analyse sind in Kapitel 5.2.3 zusammengestellt.

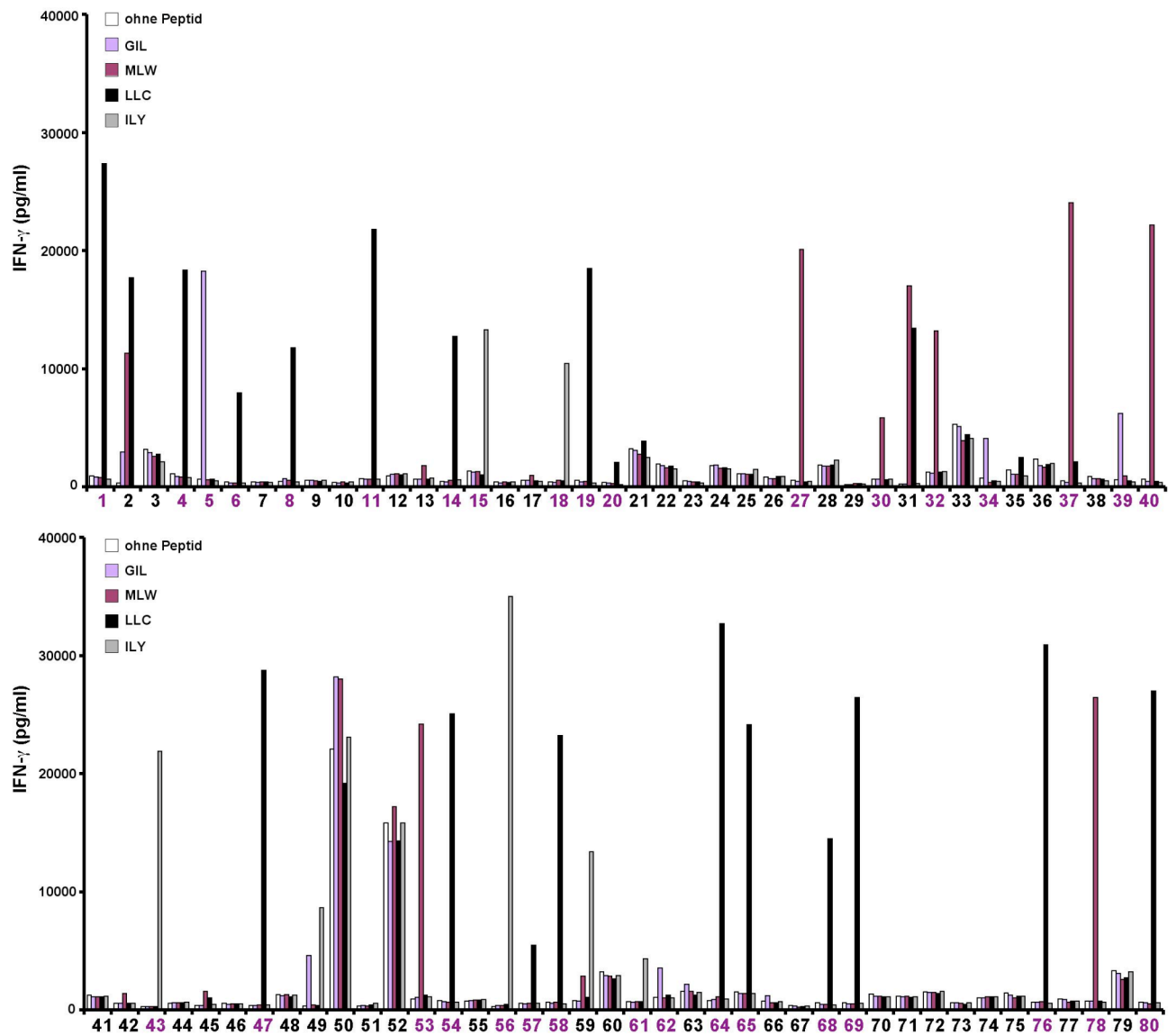
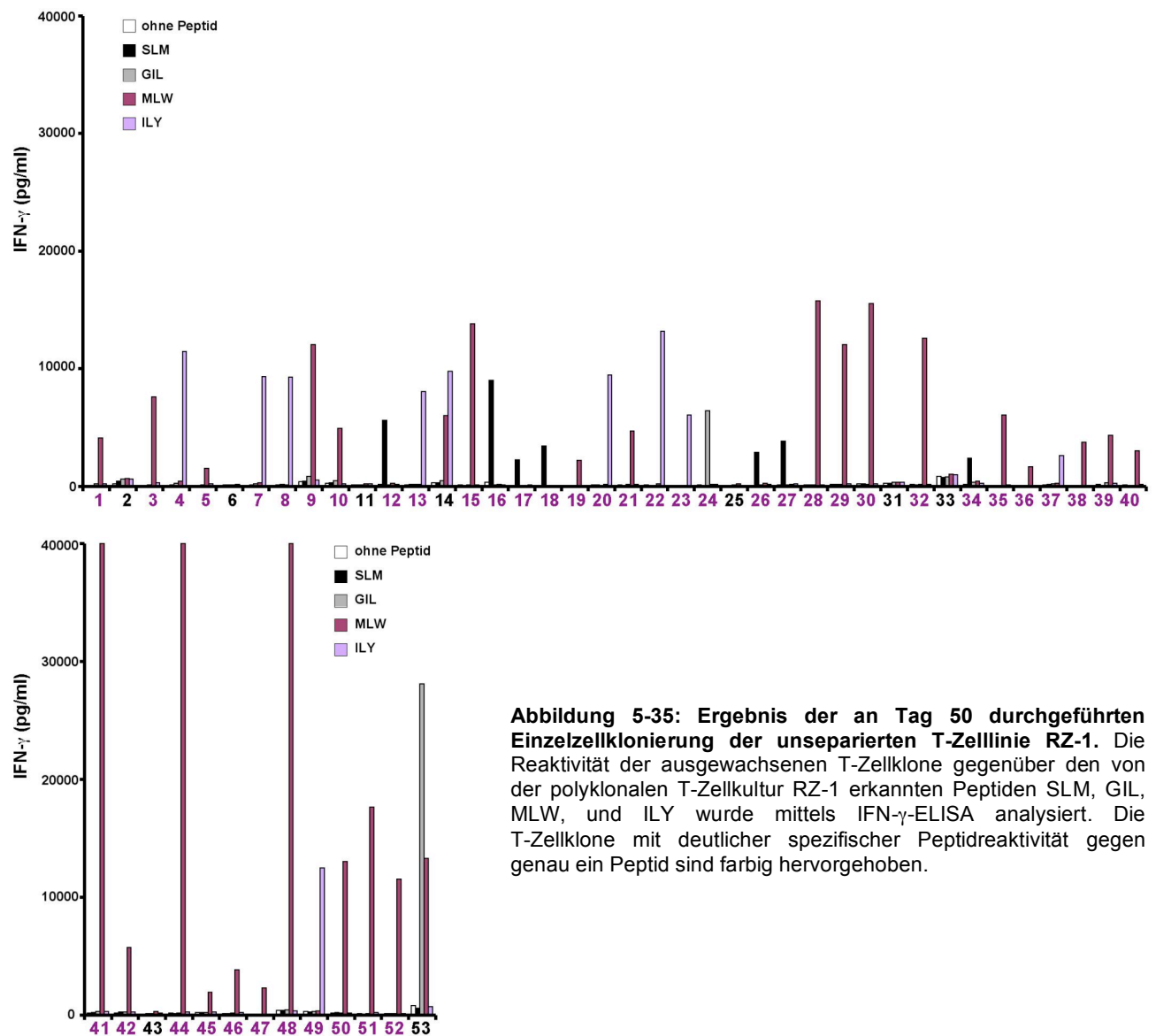


Abbildung 5-34: Ergebnis der an Tag 43 durchgeführte Einzelzellklonierung der CD8-separierten T-Zelllinie AS-1. Die Reaktivität der ausgewachsenen T-Zellklone gegenüber den von der polyklonalen T-Zellkultur AS-1 erkannten Peptide GIL, MLW, LLC und ILY wurde mittels IFN- γ -ELISA analysiert. Die T-Zellklone mit deutlicher spezifischer Peptidreaktivität sind farbig hervorgehoben.

Nach Einzelzellklonierung der unseparierten T-Zelllinie RZ-1 an Tag 50 habe ich unter 53 ausgewachsenen und getesteten T-Zellklonen 7 SLM-spezifische, einen GIL-spezifischen, 27 MLW-spezifische und 9 ILY-spezifische Klone, also insgesamt 44 HHV-6-peptidspezifische T-Zellklone erhalten (Abbildung 5-35). Auch für diesen Spender konnten alle innerhalb der polyklonalen T-Zelllinie RZ-1 vorhandenen Peptidspezifitäten (Abbildung 5-33B) auf klonaler Ebene bestätigt werden. Das Verhältnis der erhaltenen Klonreaktivitäten entsprach auch in etwa dem Verhältnis der Menge an sezerniertem IFN- γ nach Kokultur der polyklonalen T-Zelllinie mit den jeweiligen Peptiden. Dies lässt darauf schließen, dass die Anteile der in der polyklonalen Kultur enthaltenen, für die jeweiligen HHV-6-Peptide spezifischen T-Zellen durch das Klonierungsergebnis relativ gut repräsentiert werden. Auch von diesem Spender wurde je Peptidspezifität ein T-Zellklon, jedoch bisher noch kein MLW-spezifischer T-Zellklon, genauer

charakterisiert (RZ-17 SLM, RZ-24 GIL, RZ-7 ILY). Die Ergebnisse der Analysen sind in Kapitel 5.2.3 zusammengestellt.



5.2.3 Charakterisierung der HHV-6-spezifischen T-Zellklone

Die aus den Einzelzellklonierungen der HHV-6-peptidstimulierten T-Zelllinien der Spender AH, AS und RZ wie oben beschrieben hergestellten T-Zellklone (Tabelle 5-VII) wurden im Folgenden detailliert untersucht.

Als erstes habe ich die T-Zellen durchflusszytometrisch auf ihre Expression der Oberflächenmarker CD3 und CD8 und auf ihre Bindungsfähigkeit an das entsprechende Peptid/HLA-Multimer untersucht (Abbildung 5-36). Hierzu wurden entsprechende Peptid/HLA-Pentamere für die Peptide MLW und ILY synthetisiert (Prolimmune, Oxford, England). Die gesamte Population der ILY-spezifischen T-Zellklone AS-15 ILY und RZ-7 ILY war CD8-positiv und konnte mit dem ILY-Pentamer gefärbt werden (Abbildung 5-36). Innerhalb der MLW-spezifischen

T-Zelllinien AH-4 MLW und AS-30 MLW war ein Anteil an MLW-pentamerpositiven, CD8-positiven Zellen nachweisbar. Die T-Zellkultur AH-4 MLW bestand jedoch nur zu etwa 7% aus MLW-pentamerpositiven, CD8-positiven Zellen. Der Hauptanteil der restlichen Zellen war CD8-positiv und hat nicht an das MLW-Pentamer gebunden. Dies deutet auf eine Verunreinigung der T-Zellkultur mit anderen MLW-unspezifischen CD8-T-Zellen hin. Die Linie AH-4 MLW ist also keine monoklonale T-Zellkultur.

Tabelle 5-VII: Übersicht über die näher charakterisierten HHV-6-spezifischen T-Zellklone

T-Zellklon	HHV-6B-Antigen	Epitop	Aminosäureposition	HLA-Restriktion	Spender
RZ-17 SLM	U11	SLMSGVEPL	381-389	HLA-A2	RZ
RZ-24 GIL	U11	GILDFGVKL	413-421	HLA-A2	RZ
AS-62 GIL	U11	GILDFGVKL	413-421	HLA-A2	AS
AS-30 MLW	U11	MLWYTVYNI	171-179	HLA-A2	AS
AH-4 MLW	U11	MLWYTVYNI	171-179	HLA-A2	AH
AS-6 LLC	U54	LLCGNLLIL	195-203	HLA-A2	AS
AS-15 ILY	U54	ILYGPLTRI	129-137	HLA-A2	AS
RZ-7 ILY	U54	ILYGPLTRI	129-137	HLA-A2	RZ

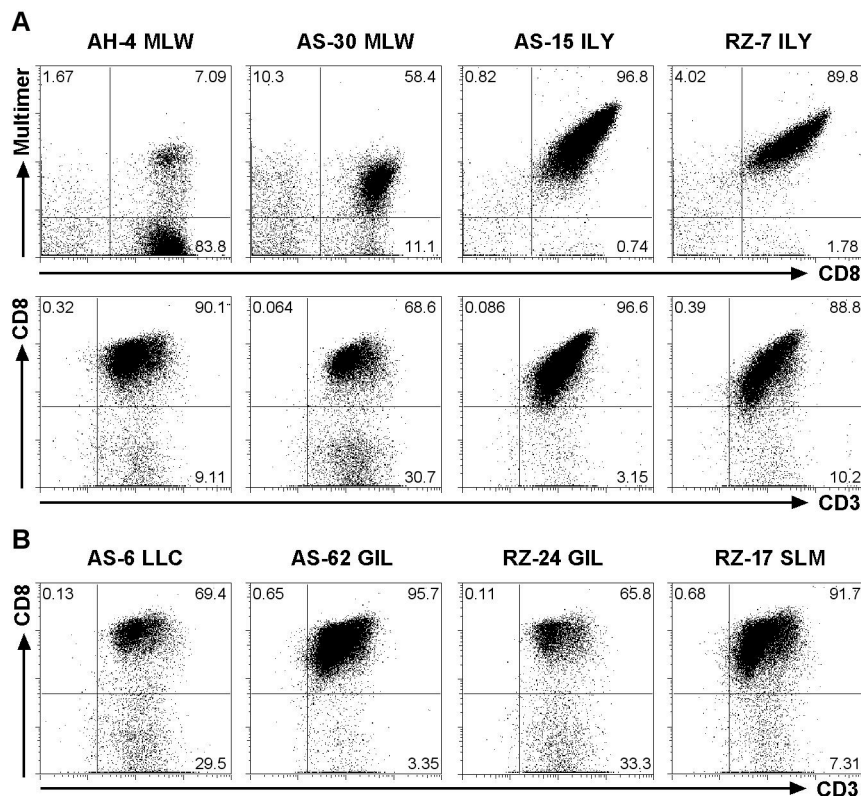


Abbildung 5-36: Phänotypische Analyse der HHV-6-spezifischen T-Zellklone der Spender AH, AS und RZ. (A) Peptid/HLA-Bindung der MLW- und ILY-spezifischen T-Zellklone AH-4 MLW, AS-30 MLW, AS-15 ILY und RZ-7 ILY wurde mittels Färbung mit dem entsprechenden Peptid/HLA-Multimer und anti-CD8-Antikörper überprüft. Die Expression der Oberflächenmarker CD3 und CD8 wurde in der gleichen Färbung mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. (B) Der T-Zellphänotyp der HHV-6-spezifischen Klone AS-6 LLC, AS-62 GIL, RZ-24 GIL und RZ-17 SLM wurde durch Färbung mit anti-CD3- und anti-CD8-Antikörper charakterisiert. Mangels der entsprechenden Peptid/HLA-Multimere konnte die Peptid/HLA-Bindung bei diesen T-Zellklonen nicht überprüft werden.

Auch die T-Zelllinie AS-30 MLW besteht nur zu etwa 58% aus $MLW^+/CD8^+$ Zellen. Nachdem zum Zeitpunkt der Analyse die T-Zelllinie allerdings auch nur sehr schlecht proliferierte, waren die übrigen in der Kultur enthaltenen Zellen höchstwahrscheinlich Reste bestrahlter Stimulator-T-Zellen, welche zur Kultivierung der T-Zellen alle zwei Wochen zugesetzt wurden. Die Stimulatorzellreste entsprachen etwa 40% der Gesamtkultur und setzten sich zu etwa zwei Teilen aus CD8-negativen und zu einem Teil aus CD8-positiven Zellen zusammen. Diese Verteilung war auch zu anderen Analysezeitpunkten des AS-30 MLW-Klons zu beobachten (Daten nicht gezeigt), wobei die Proliferation über den gesamten Kulturzeitraum hinweg vergleichsweise schlecht war. Die Stabilität des Anteils an $MLW^+/CD8^+$ Zellen bei etwa 60% lässt also darauf schließen, dass es sich um keine Verunreinigung der Kultur mit anderen proliferierenden T-Zellen handelte, sondern die T-Zellkultur monoklonal ist.

Für die Analyse der LLC-, GIL- und SLM-spezifischen T-Zellklone standen die jeweiligen Peptid/HLA-Multimere leider nicht zur Verfügung. Das LLC-Pentamer konnte, vermutlich wegen der hohen Hydrophobizität des Peptids, nicht synthetisiert werden (Prolimmune, Oxford, England). Deshalb wurde nur die Expression der T-Zelloberflächenantigene CD3 und CD8 überprüft (Abbildung 5-36B). Alle Klone waren größtenteils CD3- und CD8-positiv. Die vor allem bei den Klonen AS-6 LLC und RZ-24 GIL recht hohen Anteile an $CD3^+/CD8^-$ Zellen können ähnlich wie oben durch verbleibende Stimulatorzellen in der Kultur erklärt werden, da auch diese T-Zellkulturen nicht besonders gut proliferierten.

HLA-A2-restringierte Erkennung der HHV-6-Peptide:

Wie in Abbildung 5-37 gezeigt ist, erkannten alle untersuchten HHV-6-spezifischen T-Zellklone das entsprechende HHV-6-Epitop erwartungsgemäß nur dann, wenn es auf HLA-A2-Molekülen präsentiert wurde. HLA-A2-positive Zielzellen wurden nur im peptidbeladenen Zustand erkannt und HLA-A2-negative Zielzellen wurden unabhängig von der An- oder Abwesenheit des HHV-6-Peptids gar nicht erkannt. Die Art der eingesetzten B-Zellen – LCL, mLCL oder BBL – spielte dabei keine Rolle.

Der T-Zellklon AS-15 ILY zeigte als einziger eine HHV-6-peptidunabhängige Nebenreaktivität. Diese richtete sich gegen B-Zellen des HLA-A2-negativen Spenders AM und war unabhängig vom Peptid ILY. Sowohl BBLs als auch mLCLs wurden erkannt. Die B-Zellen des zweiten HLA-A2-negativen Spenders MB wurden hingegen nicht erkannt. Dies lässt auf eine Kreuzreaktivität des ILY-spezifischen T-Zellklons AS-15 ILY gegenüber einem B-Zellantigen oder Alloantigen schließen. Das entsprechende Peptid wird wahrscheinlich auf einem HLA-Molekül präsentiert, welches weder auf autologen Zellen des T-Zellspenders AS noch auf Zellen des Spenders MB, jedoch auf den Zellen von AM exprimiert wird. Aufgrund der niedrigen Übereinstimmung der HLA-Typen dieser drei Spender (Tabelle 3-I, Seite 21), kommen mehrere HLA-Moleküle für die Präsentation des Alloantigens in Frage. Die Kreuzreaktivität kann anhand dieser Analysen leider nicht ausreichend eingegrenzt werden. Es sind somit detailliertere Untersuchungen notwendig.

Die Reaktivitätsanalyse der MLW-spezifischen T-Zelllinien AS-30 MLW und AH-4 MLW suggeriert eine Erkennung von MLW-Peptid, das auf der HLA-A2-negativen mLCL AMW14 präsentiert wird. Da diese scheinbar nicht HLA-A2-vermittelte Erkennung sehr viel schwächer ist als die HLA-A2-vermittelte Erkennung bzw. nur leicht höher als die durch die Analysemethode detektierte Hintergrundreaktivität, ist es wahrscheinlich, dass durch die Peptidbeladung der B-Zellen vor der Analyse noch lösliche Peptidreste mit in die Kokultur gebracht wurden. Da die T-Zellen selbst HLA-A2-Moleküle auf der Oberfläche tragen, besteht die Möglichkeit, dass das lösliche Peptid auf diese Moleküle geladen wurde und so als Peptid/HLA-Komplex von den T-Zellen erkannt wurde.

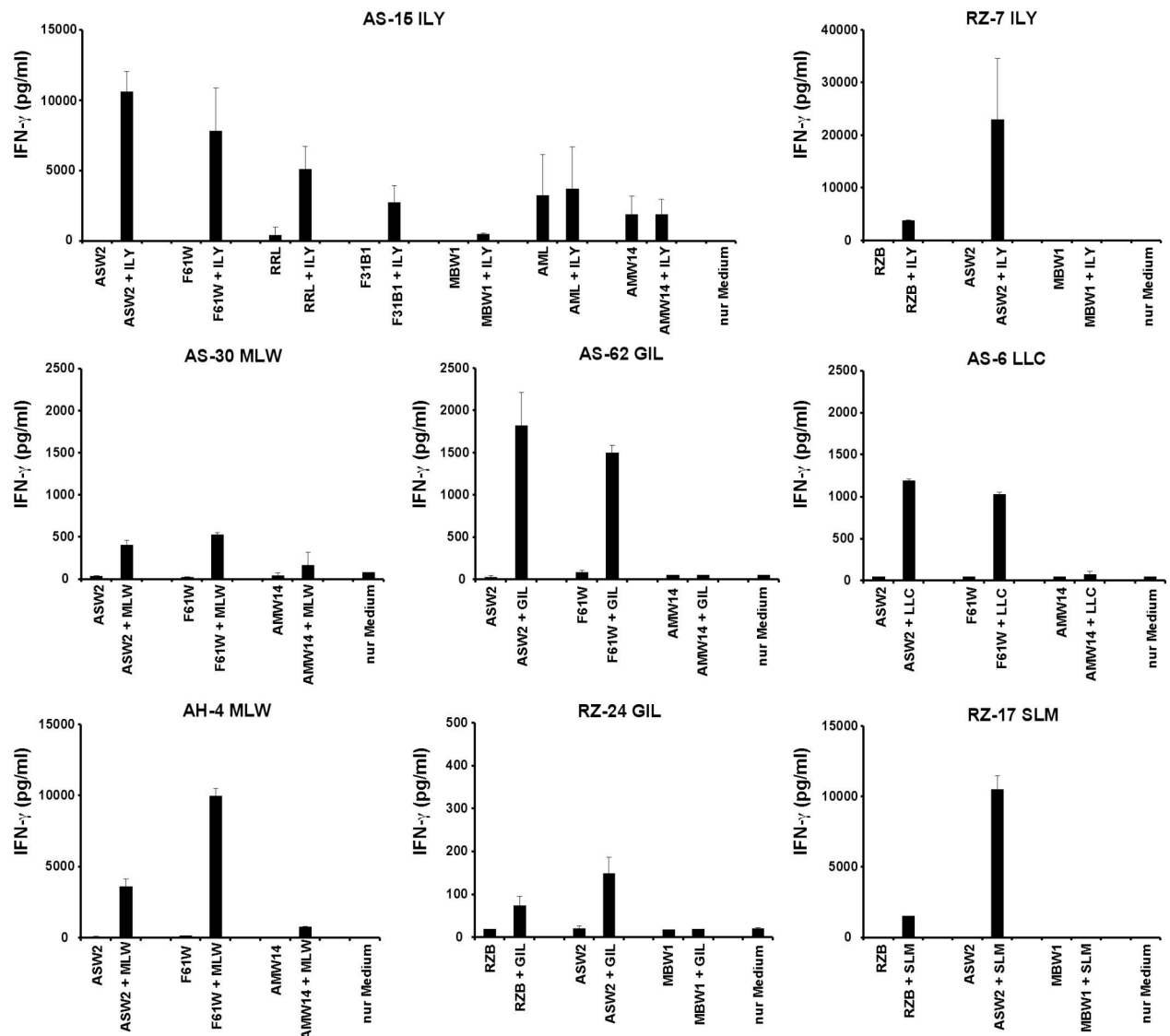


Abbildung 5-37: HHV-6-Peptiderkennung der HHV-6-spezifischen T-Zellklone der Spender AS, RZ und AH. Die T-Zellklone wurden mit autologen (AS-Klone, ASW2-mLCL; RZ-Klone, RZB-LCL) und zur vorhergesagten HLA-Restriktion des jeweiligen T-Zellklons passenden bzw. nicht passenden allogenen B-Zellen, die zuvor mit dem entsprechenden HHV-6-Peptid (ILY, MLW, GIL, LLC, SLM) beladenen worden waren, kokultiviert. Eingesetzte HLA-A2-positive B-Zelllinien: ASW2 (mLCL), F61W (mLCL), RZB (LCL), F31B1 (LCL), RRL (BBL); eingesetzte HLA-A2-negative B-Zelllinien: MBW1 (mLCL), AMW14 (mLCL), AML (BBL). Die Menge an sezerniertem IFN- γ wurde mittels ELISA bestimmt. Es sind Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikaten gezeigt.

Im Folgenden habe ich die Avidität der Peptiderkennung der T-Zellklone untersucht (Abbildung 5-38). Die durch Peptidstimulation hergestellten HHV-6-spezifischen T-Zellklone besitzen eine

niedrige bis mittlere Avidität. Die T-Zellklone AS-15 ILY und RZ-7 ILY beispielsweise erkennen das entsprechende Peptid nur, wenn es in sehr hoher Konzentration ($>10^{-7}$ M) vorhanden ist. Der GIL-spezifische T-Zellklon AS-62 GIL erkennt jedoch das Peptid schon ab einer Konzentration von 10^{-9} M.

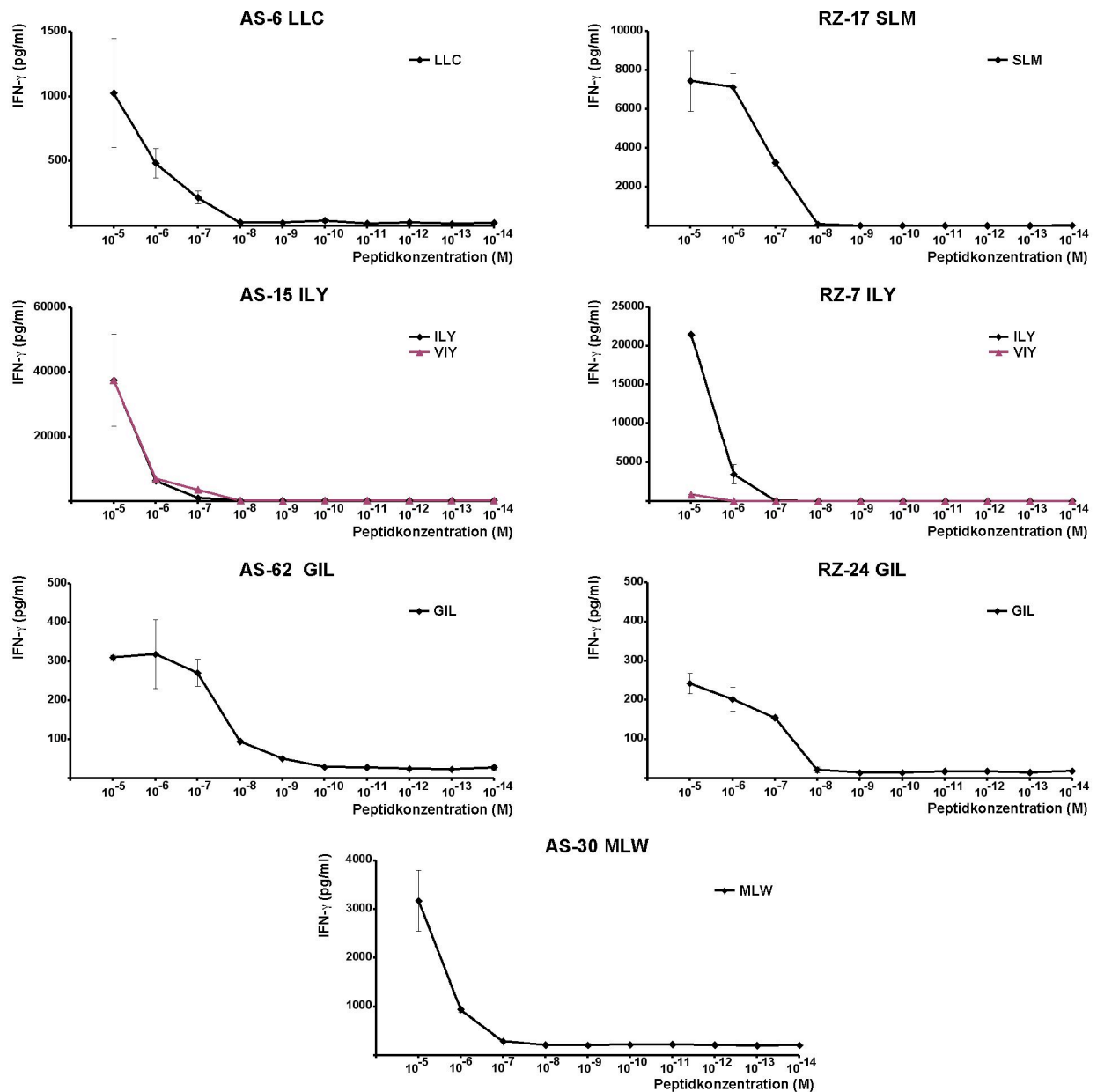


Abbildung 5-38: Analyse der funktionellen Avidität der HHV-6-spezifischen T-Zellklone. Die HHV-6-spezifischen T-Zellklone wurden mit allogenen HLA-A2-positiven B-Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen des entsprechenden HHV-6-Peptids (LLC, SLM, ILY, VIY, GIL, MLW) kokultiviert. Die Menge an ausgeschüttetem IFN- γ im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikaten gezeigt.

Allgemein will ich hier kurz anmerken, dass die hier verwendete Methode zur Bestimmung der T-Zellavidität, welche durchaus als eine Standardmethode angesehen wird, sich besonders gut zum Vergleich von verschiedenen, für das selbe Epitop spezifischen T-Zellklonen eignet. Die erzielten Ergebnisse bezüglich der Erkennung einer bestimmten Menge an Peptid sind jedoch als absoluter Maßstab nur bedingt geeignet, da vergleichbare Rahmenbedingungen vorausgesetzt

werden, die nicht immer erfüllt sind. So wird zum Beispiel angenommen, dass die im Versuch eingesetzten synthetischen Peptide die gleiche Löslichkeit in Zellkulturmedium sowie eine ähnliche Stabilität haben. Beide Eigenschaften hängen sehr stark von der Aminosäuresequenz der Peptide ab. Das Peptid kann durch Art und Dauer der Lagerung unterschiedlich stark abgebaut werden. In manchen Fällen können auch Abbauprodukte noch von den T-Zellklonen erkannt werden, während das in anderen Fällen vielleicht nicht so ist. Diese Parameter entscheiden also über die tatsächlich aktive Peptidkonzentration, welche sich von der nominellen Konzentration teils erheblich unterscheiden kann.

Gleichzeitig habe ich durch Peptidtitration auf antigenpräsentierenden Zellen überprüft, ob die durch Stimulation mit dem HHV-6B-Peptid ILY generierten T-Zellklone AS-15 ILY und RZ-7 ILY das homologe Peptid aus dem U54-Protein von HHV-6A (VIY) erkennen (Abbildung 5-38, 2. Reihe). Die Peptide ILY (ILYGPLTRI) und VIY(VIYGPLTRI) unterscheiden sich nur in den ersten beiden Aminosäuren des Nonamers und die abweichenden Aminosäurereste sind chemisch sehr ähnlich. Eine Bindung an das HLA-A2-Molekül ist also denkbar, weil sich die für die Bindung an das HLA-Molekül wichtigen Ankerreste in Position 2 (Leucin bei ILY, Isoleucin bei VIY) kaum und in Position 9 gar nicht unterscheiden. Der T-Zellklon AS-15 ILY erkennt beide Peptide mit etwa der gleichen Avidität, wohingegen der Klon RZ-7 ILY das ILY-Peptid erheblich besser erkennt als das VIY-Peptid. Die TCR V β -Kette des AS-15 ILY-Klons konnte durch durchflusszytometrische Untersuchung mit Hilfe von 24 TCR V β -spezifischen Antikörpern als V β 13.2 definiert werden, wohingegen keiner der Antikörper zur Färbung des TCRs des RZ-7 ILY-Klons geeignet war. Die beiden ILY-Klone exprimieren also verschiedene ILY-spezifische TCRs auf ihrer Oberfläche, was die unterschiedliche Avidität zu VIY der Klone erklärt. Da vom T-Zellklon AS-15 ILY sowohl das HHV-6A- wie auch das HHV-6B-Peptid erkannt wurde, ist eine Reaktivität dieses T-Zellklons gegenüber beiden Viren – HHV-6A wie HHV-6B – denkbar, falls jedes der Peptide bei der endogenen Prozessierung der entsprechenden HHV-6-Proteine entsteht.

Erkennung von endogen prozessiertem Antigen:

Als nächstes habe ich untersucht, ob die vorhergesagten und als Peptid von den T-Zellen erkannten HHV-6-Epitope beim intrazellulären Abbau der entsprechenden HHV-6B-Proteine U11 und U54 überhaupt entstehen und nach endogener Prozessierung auf HLA-A2-Moleküle geladen werden.

Dazu wurden zunächst Plasmide für die transiente Expression der HHV-6B-Proteine U11 und U54 hergestellt (pCMV-FLAG-U11, pCMV-FLAG-U54). Nachdem das U11-Protein mit 858 Aminosäuren recht groß ist und dadurch die Wahrscheinlichkeit einer fehlerhaften oder unvollständigen Synthese steigt, wurden noch zwei weitere Expressionsplasmide hergestellt, die nur die genetische Information für die ersten 214 bzw. 435 Aminosäuren des U11-Proteins enthalten (pCMV-FLAG-U11-214aa, pCMV-FLAG-U11-435aa). Die Proteine wurden bei dieser Gelegenheit zusätzlich mit einem N-terminalen FLAG-Epitop (Aminosäuresequenz: DYKDDDDK)

versehen, welches sich zum Nachweis der exprimierten Proteine mittels FLAG-spezifischem Antikörper eignet. Die Expression der HHV-6 Gene steht unter Kontrolle des CMV-Promotors (für Details zur Herstellung der Plasmide siehe 4.1.5, Seite 35).

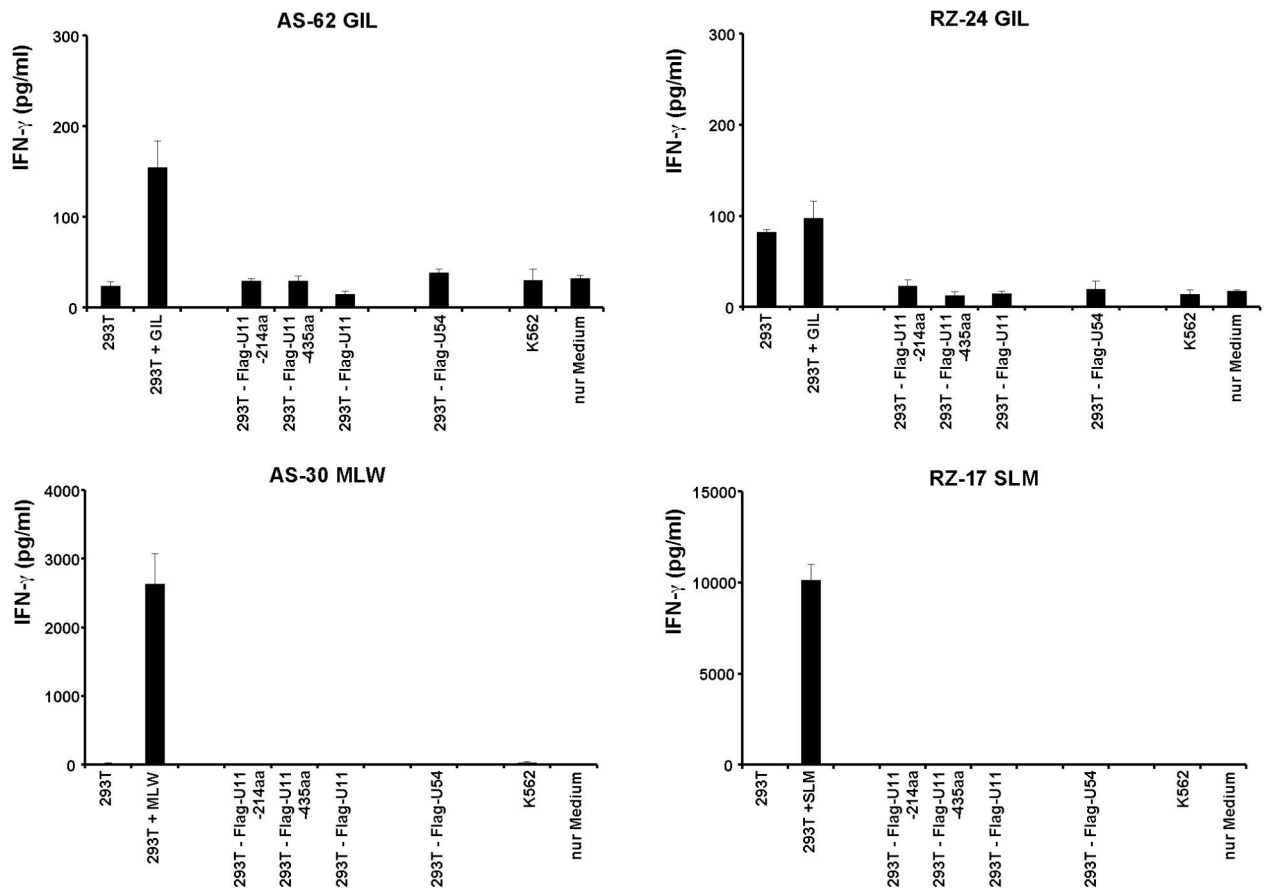


Abbildung 5-39: Überprüfung der Erkennung von endogen prozessiertem Antigen durch die U11-spezifischen T-Zellklone. 293T-Zellen wurden mit Plasmidvektoren für die transiente Expression des U11-Proteins bzw. der U11-Proteinfragmente U11-214aa und U11-435aa transfiziert und nach etwa 24h mit den U11-peptidspezifischen T-Zellklonen AS-30 MLW, AS-62 GIL, RZ-24 GIL und RZ-17 SLM kokultiviert. Zur Negativkontrolle wurden mit dem U54-Plasmid transfizierte 293T-Zellen verwendet. Als Positivkontrolle wurden mit dem entsprechenden HHV-6-Peptid (MLW, GIL, SLM) beladene 293T-Zellen eingesetzt. Als weitere Negativkontrollen dienten unbeladene 293T-Zellen, die MHC-defizienten K562-Zellen und eine Kultur ohne Zielzellen. Die Menge an sezerniertem IFN- γ wurde mittels ELISA detektiert. Es sind die Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikaten gezeigt.

Zum Nachweis der Erkennung von endogen prozessiertem U11-Antigen wurden die HLA-A2-positiven 293T-Zellen mit den Expressionsvektoren transfiziert und mit den HHV-6-peptidspezifischen T-Zellklonen AS-30 MLW, AS-62 GIL, RZ-24 GIL und RZ-17 SLM kokultiviert. Die Reaktivität der T-Zellen wurde anhand der spezifischen Ausschüttung von IFN- γ in den Zellkulturüberstand analysiert.

Die Gensequenz für das U11-Epitop MLW ist in allen hergestellten U11-Expressionsplasmiden enthalten, während die Gensequenzen für die Epitope GIL und SLM nur in den Expressionsvektoren pCMV-FLAG-U11 und pCMV-FLAG-U11-435aa enthalten sind. Leider konnte für keinen der getesteten U11-peptidspezifischen T-Zellklone eine Erkennung von endogen prozessiertem U11-Protein nachgewiesen werden (Abbildung 5-39). Weder die das Gesamtprotein U11 synthetisierenden noch die die kürzeren U11-Fragmente exprimierenden 293T-Zellen wurden

von den T-Zellklonen erkannt. Um auszuschließen, dass die eingesetzten 293T-Zellen eine zu niedrige HLA-A2-Expression aufweisen und damit lediglich eine ausreichende Präsentation des jeweiligen U11-Epitops verhindern, wurden die 293T-Zellen mit löslichem Peptid beladen und ihre Erkennung durch die T-Zellklone überprüft. Alle getesteten T-Zellklone zeigten erwartungsgemäß eine spezifische Reaktivität gegenüber den HHV-6-peptidbeladenen Zellen, wohingegen die unbeladenen 293T-Zellen nicht erkannt wurden. Im Falle des RZ-24 GIL-Klons war die Reaktivität gegenüber unbeladenen Zellen allerdings auch erhöht. Nachdem jedoch die transfizierten Zellen nicht erkannt wurden, gehe ich von einem experimentellen Fehler bei diesem Kokultivierungsansatz aus. Um dies zu bestätigen, sollte dieses Experiment nochmals wiederholt werden.

Eine Erkennung von endogen prozessiertem U11-Antigen durch die HHV-6-peptidspezifischen T-Zellklone konnte damit nicht nachgewiesen werden. Es ist deshalb denkbar, dass die für die Stimulation der T-Zellen eingesetzten, vorhergesagten U11-Epitope beim Abbau des U11-Proteins in der Zelle nicht entstehen oder, falls sie entstehen, nicht auf MHC-Moleküle geladen und an die Zelloberfläche transportiert werden können. Damit wären die hergestellten T-Zellen voraussichtlich nicht spezifisch für das HHV-6B-Virus. Im Stimulationsansatz, auf den die T-Zellklone zurückgehen, hat also entweder eine Primäraktivierung naiver T-Zellen gegen das synthetische Peptid stattgefunden, oder, was wahrscheinlicher ist, es wurden Gedächtnis-T-Zellen reaktiviert, die mit den synthetischen Peptiden kreuzreagieren. Alternativ ist möglich, dass das U11-Protein bzw. die U11-Proteinfragmente nur in geringen Mengen synthetisiert werden und die HHV-6-Epitope als Proteinabbauprodukte dadurch in zu niedriger Konzentration vorliegen. Die HHV-6-Peptid/HLA-A2-Dichte an der Zelloberfläche könnte damit zu niedrig sein, um die nicht sehr hoch aviden T-Zellklone (Abbildung 5-38, Seite 93) zur IFN- γ -Ausschüttung zu aktivieren. Im Kontext physiologisch HHV-6-infizierter Zellen dagegen (z.B. T-Zellen, die höhere HLA-Klasse-I-Expressionsniveaus haben als 293T-Zellen), bei potentiell höherer Expression des Antigens U11, könnte eine Erkennung durch U11-spezifische T-Zellen möglich sein. Sowohl für die Positivkontrolle des Experiments als auch für die Stimulation der T-Zelllinien wurde 1 μ g/ml lösliches HHV-6-Peptid – also eine aphysiologisch hohe Konzentration – zur Beladung der APCs eingesetzt. Um das Reaktivitätsspektrum der U11-peptidspezifischen T-Zellklone genauer zu charakterisieren, sind also detailliertere Untersuchungen der Expression und Prozessierung des U11-Proteins notwendig.

Analog zu den Untersuchungen der U11-peptidspezifischen T-Zellklone wurde die Erkennung von endogen prozessiertem Antigen durch die U54-spezifischen T-Zellklone analysiert. Dazu wurden die HLA-A2-positiven 293T-Zellen mit dem U54-Expressionsplasmid transfiziert und mit den ILY-spezifischen T-Zellklonen AS-15 ILY und RZ-7 ILY sowie dem LLC-spezifischen Klon AS-6 LLC kokultiviert. Alle drei getesteten T-Zellklone zeigten eine spezifische IFN- γ -Ausschüttung in Reaktion auf intrazellulär exprimiertes Antigen (Abbildung 5-40). Auch die als Positivkontrolle eingesetzten ILY- bzw. LLC-peptidbeladenen 293T-Zellen wurden erkannt. Nach Kokultur der U54-

spezifischen T-Zellklone mit den U11-transfizierten 293T-Zellen konnte erwartungsgemäß keine IFN- γ -Sekretion nachgewiesen werden. Durch Zugabe von blockierendem anti-HLA-Klasse-I-Antikörper, konnte die Erkennung des endogen in 293T-Zellen prozessierten U54-Proteins weitgehend bzw. ganz verhindert werden. Dies zeigt, dass die getesteten HHV-6-spezifischen T-Zellklone auf HLA-Klasse-I-Molekülen (HLA-A2) endogen produzierte und präsentierte U54-Peptide erkennen.

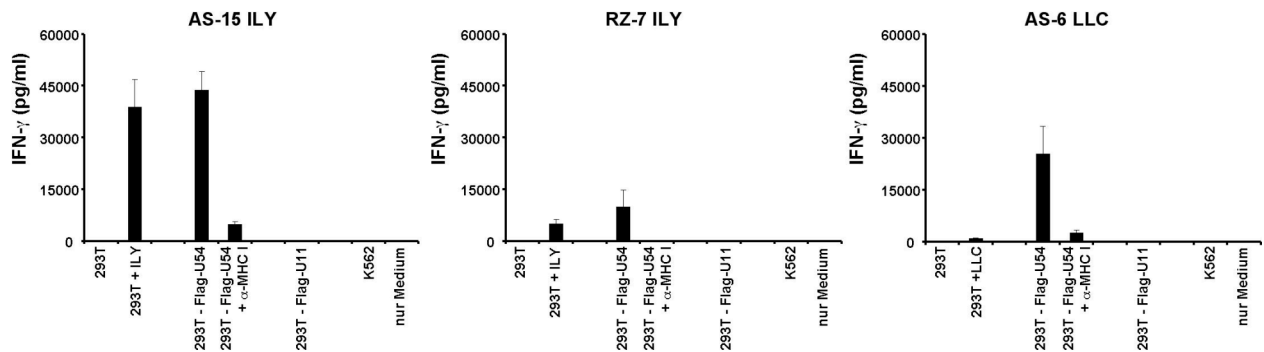


Abbildung 5-40: Überprüfung der Erkennung von endogen prozessiertem Antigen durch die U54-spezifischen T-Zellklone. 293T-Zellen wurden mit Plasmidvektoren für die transiente Expression des U54-Proteins bzw. des U11-Proteins transfiziert und nach etwa 24h mit den U54-peptidspezifischen T-Zellklonen AS-15 ILY, RZ-7 ILY und AS-6 LLC kokultiviert. Als Positivkontrolle wurden mit dem entsprechenden HHV-6-Peptid (ILY, LLC) extrazellulär beladene 293T-Zellen eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten unbeladene 293T-Zellen, die MHC-defizienten K562-Zellen und eine Kultur ohne Zielzellen. Die Menge an sezerniertem IFN- γ wurde mittels ELISA detektiert. Es sind die Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikaten gezeigt.

Reaktivität der HHV-6-spezifischen T-Zellklone gegenüber virusinfizierten T-Zellen:

Um die Reaktivität der T-Zellklone gegenüber virusinfizierten Zellen und damit die Erkennung der viralen Proteine U11 und U54 im Viruskontext zu analysieren, musste zuerst ein *in vitro*-Zellkultursystem zur Passage von HHV-6 etabliert werden. Aus Publikationen von Lusso und Kollegen war bekannt, dass HHV-6 *in vitro* vor allem CD4-positive, aktivierte T-Zellen infiziert (Lusso et al., 1988). Zur Herstellung von virushaltigen Zellkulturüberständen kann HHV-6 auf T-Zellleukämie-abgeleiteten Zelllinien, wie z.B. MOLT-3 (zur Propagierung von HHV-6B) (Ablashi et al., 1991), oder auf mit PHA (Phytohämagglutinin M) aktivierten primären mononukleären Nabelschnurblutzellen (Nabelschnur-PHA-Blasten) (Biberfeld et al., 1987) propagiert werden. Nach der HHV-6-Infektion entwickeln die Zellen – ähnlich zur CMV-Infektion – eine Zytomegalie, so dass man durch optische Kontrolle der Zellkulturen das Fortschreiten der Infektion verfolgen kann.

Ich habe beide Zellarten zur Viruspassage getestet. Im Rahmen meiner Arbeit konnten leider die HHV-6B-Virusstämme Z29 und HST nicht auf MOLT-3-Zellen propagiert werden. Selbst bei der Infektion von Kulturen mit geringer Zelldichte kam es schon nach etwa 2-3 Tagen durch die sehr starke Proliferation der bis dahin offensichtlich noch nicht infizierten MOLT-3-Zellen zu einem Überwuchern der HHV-6-infizierten Zellen. Im Mikroskop konnten zwar nach vier Tagen einzelne vergrößerte Zellen innerhalb der HHV-6B-infizierten Kultur detektiert werden (Abbildung 5-41), der

Hauptteil der Zellen war jedoch morphologisch unverändert und damit höchstwahrscheinlich nicht infiziert. Deshalb konnte die MOLT-3-Zelllinie, obwohl sie im Vergleich zu PHA-Blasten durch ihre Eigenschaft als permanent wachsende Leukämiezelllinie sehr viel praktikabler in der Handhabung wäre, zur Virusherstellung leider nicht verwendet werden.

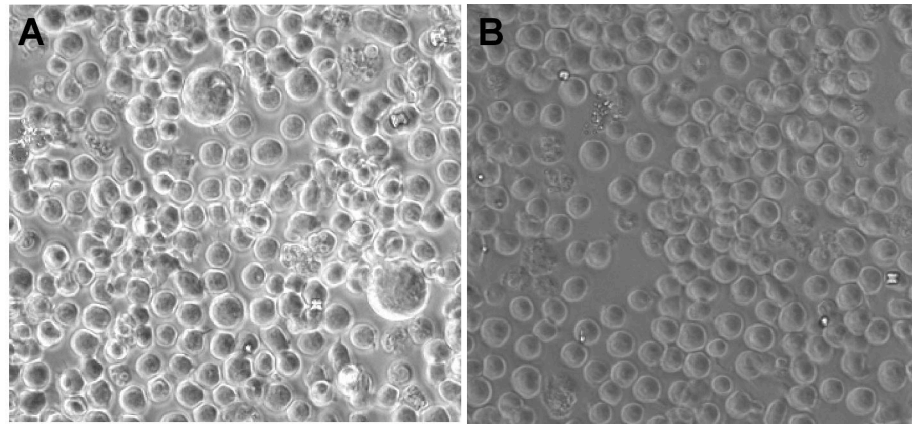


Abbildung 5-41: Morphologie von mit dem HHV-6B-Stamm Z29 infizierten MOLT-3 Zellen. An Tag 4 nach Infektion wurden charakteristische Ausschnitte der infizierten (A) und der zum Vergleich unbehandelten (B) Zellkultur am Durchlichtmikroskop in 20-facher Vergrößerung fotografiert.

Im Folgenden wurden deshalb zur Virusvermehrung die in den frisch isolierten Nabelschnurblutzellen enthaltenen T-Zellen mit PHA für 2-3 Tage aktiviert und dann mit dem HHV-6A-Virusstamm U1102 bzw. dem HHV-6B-Virusstamm HST infiziert. Bereits nach 1-2 weiteren Tagen war eine deutliche Infektion der Zellkultur anhand von morphologisch veränderten Zellen zu beobachten, die an Tag 4-5 ihren Höhepunkt erreichte. Zu diesem Zeitpunkt wurde der virushaltige Zellkulturüberstand geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Eine charakteristische Aufnahme von HHV-6-infizierten Nabelschnur-PHA-Blasten an Tag 4 nach Infektion ist unter Abbildung 5-42 gezeigt. Sowohl die mit HHV-6A als auch die mit HHV-6B infizierten Zellen sind vergrößert, wobei nur bei den HHV-6A-infizierten Zellkulturen einzelne, besonders stark vergrößerte Zellen zu finden sind. Die HHV-6A-infizierten Zellen (Abbildung 5-42A) neigen eher dazu, in Zellkonglomeraten zu wachsen, während die HHV-6B-infizierten Zellen (Abbildung 5-42B) vergleichbar mit den nicht infizierten Zellen (Abbildung 5-42C) einen Zellrasen bilden.

Für die Analyse der Reaktivität der HHV-6-spezifischen T-Zellklone gegenüber virusinfizierten Zielzellen sind PHA-Blasten aus Nabelschnurblut ungeeignet, weil ihr HLA-Typ nicht bekannt ist. Deshalb habe ich zu diesem Zweck PHA-Blasten zum einen aus unseparierten PBMCs, zum anderen aus den daraus isolierten CD4^{+} Zellen erwachsener, HLA-typisierter Blutspender hergestellt. Diese Zellen erwiesen sich auch als mit HHV-6A und -6B infizierbar, allerdings läuft der Infektionszyklus in diesen Zellen langsamer ab und verläuft abhängig vom T-Zellspender etwas unterschiedlich. Erst nach etwa 5-7 Tagen ist eine Infektion von ca. 40-60% der Zellen zu beobachten. Die Morphologie der infizierten Zellen ist mit den infizierten Nabelschnur-PHA-Blasten vergleichbar.

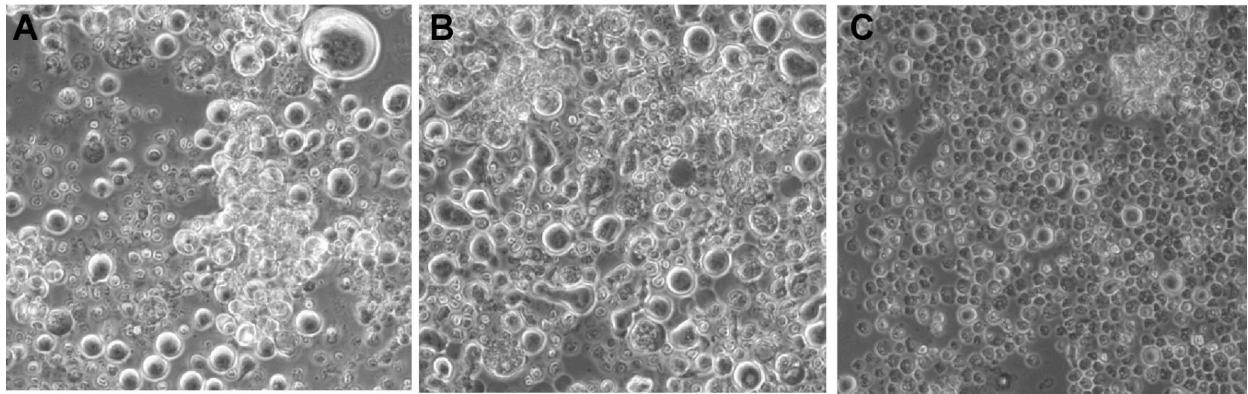


Abbildung 5-42: Morphologie von HHV-6A bzw. HHV-6B-infizierten Nabelschnur-PHA-Blasten. Die aus Nabelschnurblut isolierten Zellen wurden nach vorheriger Aktivierung durch PHA mit den HHV-6-Virusstämmen (A) U1102 (HHV-6A) und (B) HST (HHV-6B) infiziert bzw. (C) nicht infiziert. Am Tag 4 nach Infektion wurden charakteristische Ausschnitte der Zellkulturen am Durchlichtmikroskop in 20-facher Vergrößerung fotografiert.

Der U54-spezifische T-Zellklon AS-15 ILY erkennt die autologen und die allogenen HLA-A2-positiven HHV-6B (HST)-infizierten $CD4^+$ PHA-Blasten (Abbildung 5-43, A und B). Die HHV-6A (U1102)-infizierten $CD4^+$ PHA-Blasten werden allerdings, trotz Erkennung des entsprechenden HHV-6A-Peptids (Abbildung 5-38), nicht erkannt (Abbildung 5-43B). Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass das VIY-Peptid beim intrazellulären Abbau des HHV-6A-U54-Proteins nicht entsteht oder nicht auf HLA-A2 geladen wird. Bei Kokultur mit den PHA-Blasten aus unseparierten PBMCs kommt es zur stark erhöhten, HHV-6-unspezifischen Sekretion von $IFN-\gamma$ (Abbildung 5-43A). Innerhalb dieser PHA-Blasten ist sehr wahrscheinlich ein bedeutender Anteil von $CD8^+$ T-Zellen unspezifisch durch PHA aktiviert und zur $IFN-\gamma$ -Sekretion angeregt worden. $CD4^+$ T-Zellen dagegen, die Hauptzielzellen der HHV-6-Infektion *in vitro*, sind in der Unterzahl, was wahrscheinlich zur schlechteren Infektion der Zielzellen und außerdem zu einem schlechteren Effektor:Stimulator-Verhältnis führt. Dadurch ist eine HHV-6-spezifische $IFN-\gamma$ -Sekretion durch den T-Zellklon AS-15 ILY nicht detektierbar. Der erhöhte $IFN-\gamma$ -Hintergrund bei der Kultur mit PHA-Blasten aus unseparierten PBMCs ist auch bei dem zweiten U54-spezifischen T-Zellklon AS-6 LLC zu beobachten (Abbildung 5-43C). Auch dieser T-Zellklon reagiert dagegen spezifisch auf die HLA-A2-positiven HST-infizierten $CD4^+$ PHA-Blasten. Die HHV-6B-spezifische $IFN-\gamma$ -Ausschüttung ist sogar trotz stark erhöhter Hintergrundreaktivität bei der Kokultur mit unseparierten PHA-Blasten des HLA-A2-positiven Spenders JJ zu sehen. Die unbehandelten und HLA-A2-negativen $CD4^+$ PHA-Blasten werden erwartungsgemäß nicht erkannt. Die Reaktivität dieses T-Zellklons gegenüber HHV-6A-infizierten Zellen wurde bisher noch nicht überprüft. Der zweite im Rahmen dieser Arbeit hergestellte und getestete ILY-spezifische T-Zellklon RZ-7 ILY zeigte leider keine signifikante HHV-6-viruspezifische Reaktivität (Abbildung 5-43D). Weder mit HHV-6A noch mit HHV-6B infizierte Zellen wurden erkannt. Es war jedoch erneut $IFN-\gamma$ -Produktion nach Kokultur mit der ILY-peptidbeladenen mLCL ASW2 nachweisbar. Dies weist wie auch schon die vorausgegangenen Analysen zur Erkennung von endogen prozessiertem U54-Protein darauf hin (Abbildung 5-40, Seite 97), dass die Affinität dieses ILY-spezifischen T-Zellrezeptors nicht ausreicht, um das endogen synthetisierte, also nicht im Überschuss vorhandene Antigen zu

erkennen. Da der Klon AS-15 ILY sein Antigen auch in transfizierten und virusinfizierten Zellen erkennt, ist klar gezeigt, dass das U54-Peptid ILY endogen prozessiert und auf HLA-A2-Molekülen an der Oberfläche präsentiert werden kann.

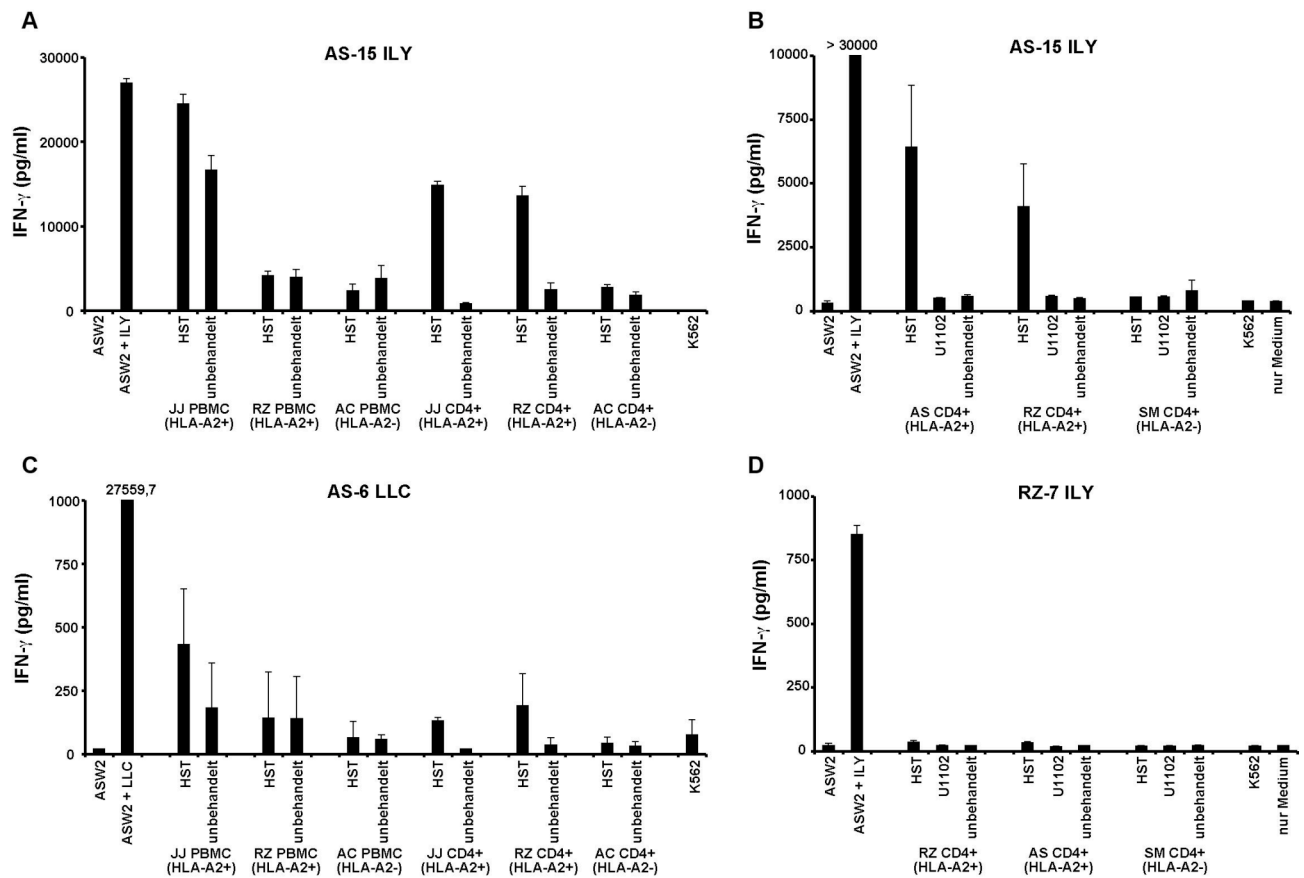


Abbildung 5-43: Erkennung von HHV-6-infizierten PHA-Blasten durch die U54-spezifischen T-Zellklone. Die T-Zellklone AS-15 ILY (A, B), AS-6 LLC (C) und RZ-7 ILY (D) wurden mit den HST (HHV-6B)- bzw. U1102 (HHV-6A)-infizierten PHA-Blasten, die aus den PBMCs oder CD4⁺ Zellen verschiedener HLA-A2-positiver und HLA-A2-negativer Spender hergestellt worden waren (wie angegeben), 6 Tage nach der HHV-6-Infektion kokultiviert. Als Kontrolle wurde die mit dem entsprechenden HHV-6B-Peptid beladene bzw. unbeladene HLA-A2-positive mLCL ASW2 verwendet. Die Menge an in den Zellkulturüberstand sezerniertem IFN- γ wurde mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten gezeigt.

Obwohl für die U11-peptidspezifischen T-Zellklone keine Erkennung von endogen prozessiertem Antigen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 5-39, Seite 95), habe ich die Reaktivität der T-Zellklone AS-62 GIL, RZ-24 GIL, AS-30 MLW und RZ-17 SLM gegenüber von mit HHV-6A bzw. HHV-6B infizierten Zellen analysiert (Abbildung 5-44). Für die Klone RZ-24 GIL, AS-30 MLW und RZ-17 SLM konnte zwar die Peptiderkennung verifiziert werden, eine spezifische Reaktivität gegenüber HHV-6-infizierten Zellen war aber nicht nachweisbar (Abbildung 5-44B-D).

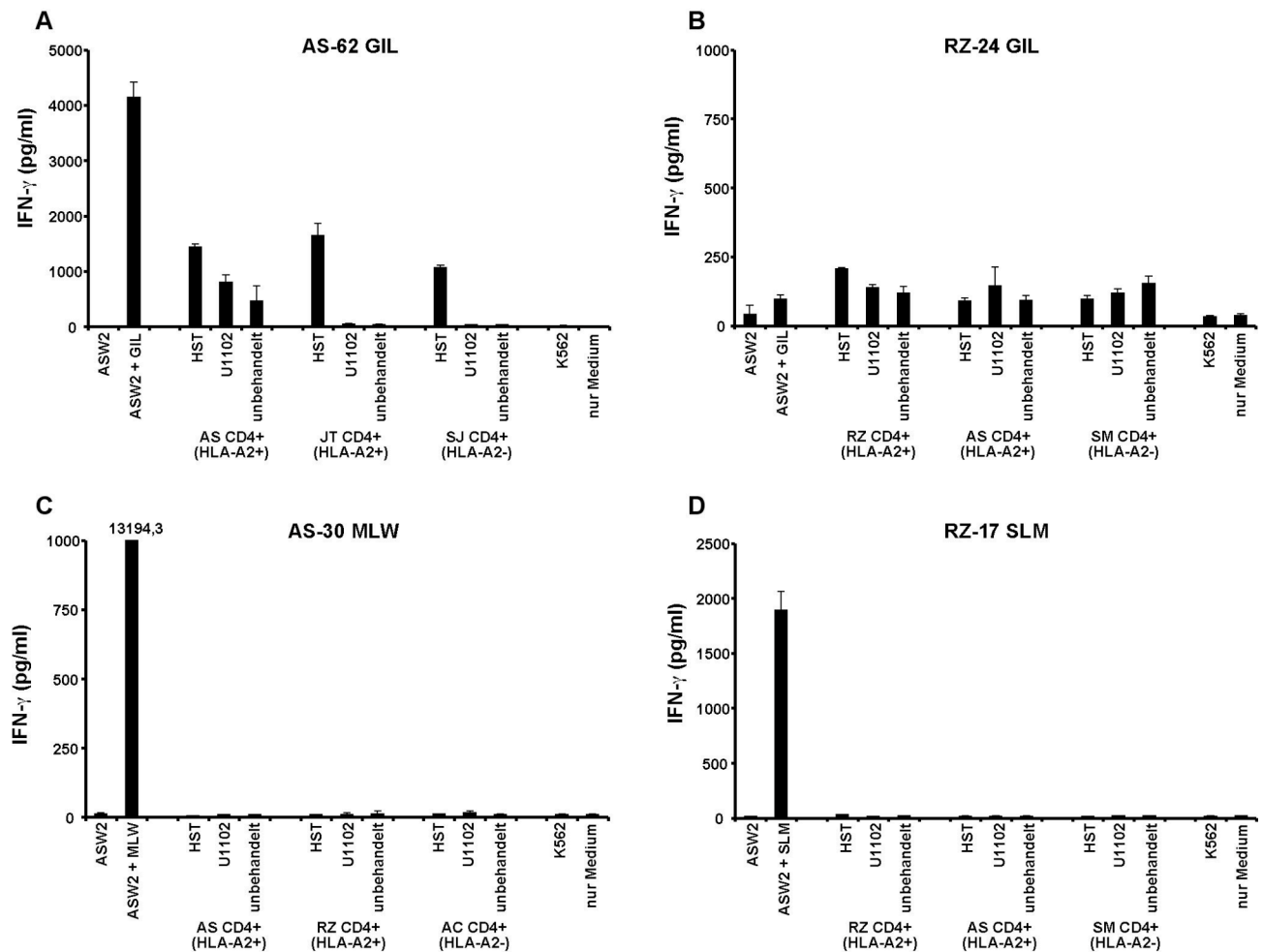


Abbildung 5-44: Erkennung von HHV-6-infizierten PHA-Blasten durch die U11-spezifischen T-Zellklone. Die T-Zellklone AS-62 GIL (A) RZ-24 GIL(B), AS-30 MLW (C) und RZ-17 SLM (D) wurden mit den HST (HHV-6B) bzw. U1102 (HHV-6A) infizierten PHA-Blasten, die aus den CD4⁺ Zellen verschiedener HLA-A2-positiver und HLA-A2-negativer Spender hergestellt worden waren (wie angegeben), 6 Tage nach der HHV-6-Infektion kokultiviert. Als Kontrolle wurde die mit dem entsprechenden HHV-6B-Peptid beladene bzw. unbeladene HLA-A2-positive mLCL ASW2 verwendet. Die Menge an in den Zellkulturüberstand sezerniertem IFN- γ wurde mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten gezeigt.

Der T-Zellklon AS-62 GIL jedoch zeigte eine HHV-6B-spezifische Ausschüttung von IFN- γ (Abbildung 5-44A). Es war allerdings unerwarteterweise auch IFN- γ -Sekretion nach Kokultur mit HST-infizierten, HLA-A2-negativen Zellen zu beobachten. Sollte diese Reaktivität wirklich mit der HLA-restringierten Erkennung von GIL-Peptid zusammenhängen, wäre folgende Erklärung denkbar: Das Virus hat zumindest teilweise auch den T-Zellklon selbst infiziert und das so endogen prozessierte Peptid kann damit von den HLA-A2-Molekülen des T-Zellklons gegenüber den anderen GIL-spezifischen T-Zellen präsentiert werden. Da ein ähnliches Phänomen bei den Untersuchungen der anderen HHV-6-spezifischen T-Zellklone nicht beobachtet wurde (Abbildung 5-43 und Abbildung 5-44B-D), ist dies als Erklärung unwahrscheinlich. Möglicherweise handelt es sich um eine bisher ungeklärte Kreuzreaktivität dieses T-Zellklons. Darüber hinaus werden durch den AS-62 GIL-Klon auch die autologen U1102-infizierten Zellen erkannt (Abbildung 5-44A). Die U1102-infizierten Zellen des ebenfalls HLA-A2-positiven Spenders JT werden dagegen nicht erkannt. Generell ist eine ungleichmäßige Infektion der Zellen der verschiedenen Spender denkbar, was zum einen zu einer unterschiedlichen Anzahl HHV-6-infizierter Zellen innerhalb der

Kokulturen und zum anderen zu einem verschiedenen zeitlichen Ablauf des Infektionszyklus und damit zu einer unterschiedlich starken Expression des jeweiligen viralen Antigens führt. Diese Variablen bei der *in vitro*-Infektion von Zellen können damit zu Schwankungen bei den Analysen zur Viruserkennung durch die HHV-6-spezifischen T-Zellklone führen. Um sicher zu beweisen, dass der Klon AS-62 GIL U11-antigenspezifisch und HLA-A2-restringiert HHV-6A- bzw. HHV-6B-infizierte Zellen über seinen T-Zellrezeptor erkennt, sind weiterführende Untersuchungen mit infizierten Zellen mehrerer Spender notwendig.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Reaktivität der HHV-6-spezifischen T-Zellklone sind zusammenfassend in der Tabelle 5-VIII dargestellt.

Tabelle 5-VIII: Übersicht über die HHV-6-spezifische Reaktivität der analysierten T-Zellklone

T-Zellklon	vorhergesagte Spezifität	Erkennung von HHV-6-Peptid ab (Abbildung 5-38, Seite 93)	Erkennung von endogenem prozessiertem Antigen (Abbildung 5-39, Seite 95 und Abbildung 5-40, Seite 97)	Erkennung von HHV-6A (U1102)-infizierten Zellen (Abbildung 5-43, Seite 100 und Abbildung 5-44, Seite 101)	Erkennung von HHV-6B (HST)-infizierten Zellen (Abbildung 5-43, Seite 100 und Abbildung 5-44, Seite 101)
AS-30 MLW	U11, MLW	10 ⁻⁶ M	nein	nein	nein
RZ-17 SLM	U11, SLM	10 ⁻⁷ M	nein	nein	nein
RZ-24 GIL	U11, GIL	10 ⁻⁷ M	nein	nein	nein
AS-62 GIL	U11, GIL	10 ⁻⁹ M	nein	unklar ¹	unklar ²
AS-15 ILY ^{3,4}	U54, ILY	10 ⁻⁷ M	ja	nein	ja
RZ-7 ILY ⁵	U54, ILY	10 ⁻⁶ M	ja	nein	nein
AS-6 LLC	U54, LLC	10 ⁻⁷ M	ja	nicht getestet	ja

¹ auch HLA-A2-negative HHV-6B-infizierte Zellen (SJ) werden erkannt

² nur autologe HLA-A2-positive HHV-6A-infizierte Zellen werden leicht erkannt

³ TCR Vβ13.2 (Arden et al., 1995)

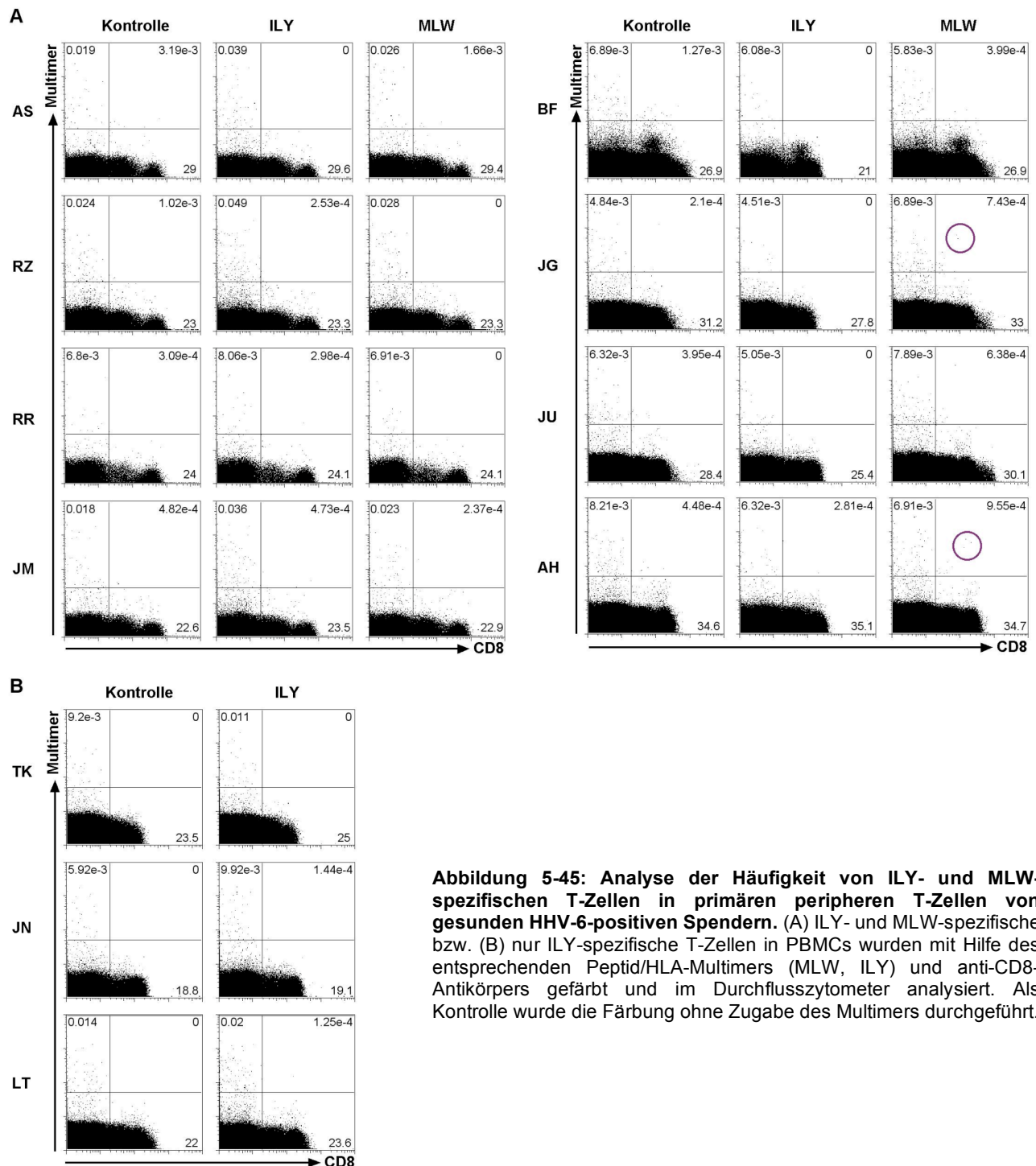
⁴ erkennt B-Zellen von AM "unspezifisch"

⁵ TCR mit FACS Vβ-Antikörper-Kit nicht detektierbar

Insgesamt konnte ich durch die ausführliche Untersuchung der hergestellten HHV-6-peptidspezifischen T-Zellklone zeigen, dass das HHV-6B-Protein U54 ein Zielantigen für die HHV-6-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort darstellt. Die vorhergesagten HLA-A2-restringierten Epitope ILY und LLC entstehen durch den intrazellulären Abbau des U54-Proteins und werden nach der endogenen Prozessierung und Präsentation auf HLA-A2-Molekülen von virusspezifischen T-Zellen erkannt. Damit ist es gelungen, erste Zielepitope der HHV-6B-spezifischen T-Zellantwort zu charakterisieren. Diese Ergebnisse könnten nun erstmals die kontrollierte Herstellung von HHV-6B-spezifischen T-Zellen aus gesunden HHV-6-positiven Spendern für die adoptive Therapie von Erkrankungen möglich machen, die durch dieses Virus hervorgerufen werden.

5.2.4 Analyse der Häufigkeit HHV-6-epitopspezifischer T-Zellen im Blut von gesunden HHV-6-positiven Spendern

Bei meinen ersten Untersuchungen der Häufigkeit von HHV-6-spezifischen T-Zellen innerhalb der Gedächtnis-T-Zellen im Blut von gesunden Virusträgern zur Charakterisierung von T-Zellepitopen und bei der Herstellung HHV-6-peptidspezifischer T-Zellen entstand der Eindruck, dass – zumindest bei den untersuchten Spendern – T-Zellen, die spezifisch die vorhergesagten Epitope erkennen, recht selten sind. Um diese Beobachtung zu überprüfen, habe ich mittels Multimerfärbung die Häufigkeit von MLW- und ILY-spezifischen T-Zellen im Blut von den ursprünglichen und weiteren HHV-6-positiven Spendern detaillierter untersucht.



Dazu wurden jeweils 1 Million PBMCs von 11 HLA-A2-positiven Spendern mit ILY-Pentamer und bei 8 Spendern in einem zweiten Ansatz mit MLW-Pentamer bei gleichzeitiger Färbung von CD8 analysiert (Abbildung 5-45). Bei allen getesteten Spendern lag die Häufigkeit von ILY- sowie auch von MLW-spezifischen T-Zellen deutlich unter 1 in 100.000 Zellen (0,001%). Bei keinem der getesteten Spender war eine deutliche Färbung von ILY-spezifischen T-Zellen zu beobachten (Abbildung 5-45), auch nicht bei den Spendern AS und RZ, von denen ILY-spezifische T-Zellklone hergestellt werden konnten. Auch innerhalb der CD8⁺ Fraktion sind nur einzelne Zellen ILY-positiv (Abbildung 5-46) und können nicht eindeutig von den vereinzelt unspezifischen Signalen (siehe Kontrolle) unterschieden werden. Die gleiche Beobachtung habe ich bei der Analyse der Häufigkeit von MLW-spezifischen T-Zellen gemacht (Abbildung 5-45A und Abbildung 5-46). Die Mehrzahl der getesteten Spender hatte keine eindeutig nachweisbare Population von MLW-spezifischen T-Zellen im Blut. Die MLW-spezifischen T-Zellen der Spender AS und RZ, die durch antigenspezifische Stimulation angereichert werden konnten und die sogar MLW-peptidspezifische IFN- γ -Sekretion zeigten, konnte ich weder in den PBMCs noch in der isolierten CD8-Population der Spender direkt *ex vivo* nachweisen. Eine eindeutige Färbung von MLW-spezifischen Zellen war jedoch bei den Spendern JG und AH (etwa 2 bis 3 MLW-spezifische Zellen pro 1.000.000) zu beobachten (Abbildung 5-45A, siehe Markierung). Bei Spender AH konnten diese MLW-spezifischen T-Zellen, im Gegensatz zum Spender JG, durch antigenspezifische Stimulation angereichert werden. MLW-spezifische T-Zellen waren auch in der Lage das Effektorzytokin IFN- γ auszuschütten (Abbildung 5-29, Seite 81; Abbildung 5-30, Seite 82).

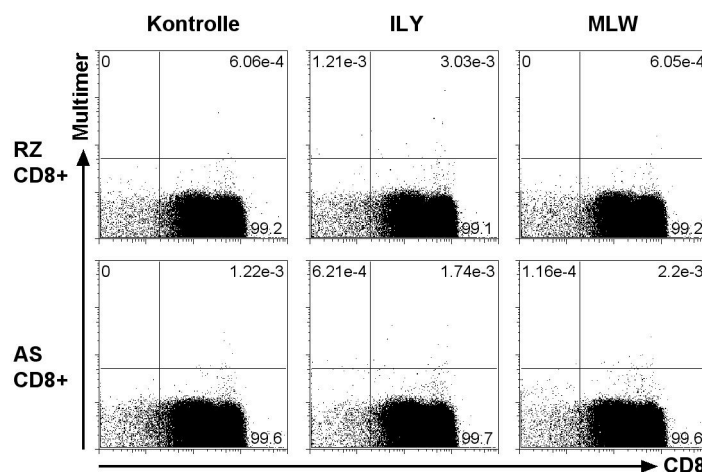


Abbildung 5-46: Analyse der Häufigkeit von ILY- und MLW-spezifischen T-Zellen in angereicherten primären CD8-positiven T-Zellen der gesunden HHV-6-positiven Spender RZ und AS. Die CD8-positiven Zellen wurden mittels magnetischer Separation aus den PBMCs von RZ und AS isoliert. In dieser Zellpopulation enthaltene ILY- und MLW-spezifische T-Zellen wurden mit Hilfe des entsprechenden Peptid/HLA-Multimers (MLW, ILY) und anti-CD8-Antikörpers gefärbt. Als Kontrolle wurde die Färbung ohne Zugabe des Multimers durchgeführt.

Insgesamt konnte damit der erste Eindruck bestätigt werden: MLW-spezifische (weniger als 1 in 100.000) und ILY-spezifische (weniger als 1 in 1.000.000) T-Zellen sind im Blut von gesunden HHV-6-positiven Spendern sehr selten.

6 Diskussion

6.1 CMV-spezifische TCR-transgene T-Zellen für die Immuntherapie

Ich habe in meiner Doktorarbeit CMV-spezifische T-Zellen von CMV-seronegativen Spendern durch retroviralen TCR-Transfer hergestellt. Die Intention dabei war zu untersuchen, ob solche T-Zellen für die Behandlung von CMV-assoziierten Erkrankungen nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (Allo-HSCT) geeignet sind.

Der Transfer von CMV-spezifischen T-Zellen hat sich als wirksam und gut verträglich für die Behandlung und Prophylaxe von CMV-Erkrankungen erwiesen (Cobbald et al., 2005; Einsele et al., 2002; Peggs et al., 2003; Riddell et al., 1992). Für die Kombination CMV-negativer Spender/CMV-positiver Empfänger (D-/R+) sind solche Zellen allerdings normalerweise nicht verfügbar. Gerade für diese Patienten ist jedoch das Risiko von CMV-Komplikationen am höchsten. D+/R+ ist momentan noch die häufigste Spender/Empfänger-Konstellation bei Allo-HSCT (Ganepola et al., 2007). Mit der sinkenden CMV-Prevalenz in der Bevölkerung wird die Häufigkeit von D-/R+ Allo-HSCT-Situationen allerdings steigen. Um die Herstellung CMV-spezifischer T-Zellen von CMV-negativen Spendern möglich zu machen, sollte deshalb der retrovirale Transfer von CMV-spezifischen T-Zellrezeptoren als Therapiemöglichkeit in D-/R+-Situationen evaluiert werden.

Die dem Dissertationsprojekt zu Grunde liegende Hypothese war, dass geeignete CMV-spezifische TCRs im T-Zellgedächtnis von CMV-seropositiven Spendern vorhanden und leicht zugänglich sind. Es wurde vorausgesetzt, dass das TCR-Repertoire der Gedächtnis-T-Zellen solcher Spender ein Reservoir für therapeutisch aktive CMV-spezifische TCRs bildet, weil es durch die Notwendigkeit, die CMV-Infektion zu kontrollieren und vor CMV-Erkrankung zu schützen, ausgebildet wurde. Um geeignete T-Zellklone als Quelle der CMV-spezifischen TCRs für den Gentransfer zu erhalten, wurde eine Screening-Prozedur angewendet, bei der ein besonderes Augenmerk auf die Erkennung von endogen prozessiertem Antigen gelegt wurde. Ich habe durch Stimulation von primären T-Zellen mit synthetischen CMV-Epitoppeptiden oder mit autologen mLCLs, die die CMV-Antigene pp65 oder IE-1 exprimieren, CMV-spezifische T-Zellklone von verschiedenen Spendern hergestellt. Es gelang, CD8⁺ wie auch CD4⁺ T-Zellklone zu charakterisieren, die sechs verschiedene pp65-Epitope (NLV, IPS, YSE, RPH, KVYL, RPHE) und zwei IE-1-Epitope (VLE, QIK) erkannten und durch unterschiedliche HLA-Allotypen (HLA-A*0101, HLA-A*0201, HLA-B*0801, HLA-B*3501 und andere) restringiert waren.

Alle hergestellten CMV-spezifischen T-Zellklone zeigten eine HLA-restringierte CMV-spezifische Reaktivität gegenüber einer beträchtlichen Auswahl an autologen und allogenen Zielzellen. Bei diesen Untersuchungen wurden keine unerwünschten Nebenreaktivitäten festgestellt, bis auf eine Ausnahme. Ein in früheren Arbeiten hergestellter **NLV-spezifischer T-Zellklon (F36-30)**, der erstmals von mir im Detail getestet wurde, zeigte neben der CMV-spezifischen Aktivität auch eine

deutliche Reaktivität gegenüber dem Allo-HLA-Molekül HLA-B*4001. CMV-spezifische T-Zellen mit dieser durch den NLV-TCR vermittelten Kreuzreaktivität wurden offenbar durch die negative Selektion der Zellen im Thymus bei dem HLA-B*4001-negativen T-Zellspender F36 nicht deletiert und blieben damit im NLV-spezifischen T-Zellrepertoire erhalten. Meistens wird angenommen, dass verschiedene Antigenspezifitäten durch verschiedene klonale T-Zellpopulationen mit unterschiedlichen TCRs repräsentiert sind. Das würde bedeuten, dass ein TCR in der Regel nur ein bestimmtes Peptidepitop auf einem bestimmten HLA-Molekül erkennt. In den letzten Jahren wurden allerdings immer mehr Ausnahmen von dieser Regel bekannt. So haben beispielsweise Burrows und Kollegen einen CD8⁺ T-Zellklon beschrieben, der das auf HLA-B*0801 präsentierte EBV-Epitop FLRGRAYGL aus dem Antigen EBNA3A spezifisch erkennt und zusätzlich eine Kreuzreaktivität gegenüber dem Alloantigen HLA-B44 zeigt (Burrows et al., 1994). Dies führte bei der EBV-spezifischen T-Zelltherapie bisher wohl nur deshalb nicht zu Komplikationen, weil der meist für die Herstellung der T-Zellen verwendete Virusstamm B95.8 infolge einer Mutation dieses T-Zellepitop verloren hat (Rooney et al., 1998). Auch für CMV-spezifische T-Zellen wurde bereits eine Allo-Kreuzreaktivität beobachtet. HLA-DR7-restringierte CD4⁺ T-Zellen, die ein Epitop aus dem viralen Glykoprotein B erkennen, reagieren zusätzlich gegen das Alloantigen HLA-DR4 (Elkington und Khanna, 2005). Darüber hinaus wurden kürzlich am Hämatologikum des Helmholtz Zentrums München monoklonale, für ein Hämatopoese-assoziiertes Antigen (FMNL1/HLA-A2) spezifische CD8⁺ T-Zellen charakterisiert, die eine Alloreaktivität gegenüber HLA-A*3303 zeigen (Schuster et al., 2007). Auch der von mir in meinem zweiten Teilprojekt generierte HHV-6-spezifische CD8⁺ T-Zellklon (AS-15 ILY) weist neben seiner HLA-A*0201-restringierten und für das HHV-6-U54-Peptid ILY spezifischen Reaktivität eine zusätzliche Kreuzreaktivität gegenüber einem der allogenen HLA-Moleküle auf den Zellen des Spenders AM auf (siehe Abschnitt 5.2.3, ab Seite 89). Diese Erkenntnisse zeigen, dass antigenspezifische T-Zellen nicht selten eine allo-Kreuzreaktivität aufweisen, und unterstreichen die Wichtigkeit der ausführlichen Testung virusspezifischer T-Zellen gegenüber einer Kollektion an allogenen Zellen mit unterschiedlichem HLA-Hintergrund. Nur so kann die Verabreichung von alloreaktiven T-Zellen bei einer adoptiven T-Zelltherapie verhindert und so unerwünschte Nebenwirkungen der Therapie vermieden werden. Die Charakterisierung des allo-HLA-B*4001-kreuzreaktiven TCRs des CMV-spezifischen T-Zellklons F36-30 ist darüber hinaus von besonderer Bedeutung, da die betroffene CMV-Epitopspezifität (Erstbeschreibung durch Diamond et al., 1997) die dominante HLA-A*0201-restringierte Spezifität gegen das CMV-Antigen pp65 ist. Bei der Mehrzahl HLA-A*0201-positiver CMV-Träger findet man vergleichsweise große Zahlen von NLV-spezifischen T-Zellen. Bei den meisten aktuellen Ansätzen zur T-Zelltherapie von CMV-assoziierten Komplikationen ist daher die Generierung von spezifischen T-Zellen gegen pp65, und dabei vor allem gegen das NLV-Epitop, Teil oder Hauptinhalt der Strategie. Dabei handelt es sich oft um eine Anwendung allogener T-Zellen, nämlich die Verabreichung von aus dem Transplantatspender gewonnenen T-Zellen nach Allo-HSCT. Diese Konstellation verdeutlicht die

Relevanz meiner Beobachtung und die Notwendigkeit, Spender-T-Zellen auf ihre mögliche Alloreaktivität zu untersuchen. Die von HLA-B*4001-negativen Spendern hergestellten NLV-spezifischen T-Zellen könnten zusätzlich zur extensiven Testung gegenüber allogenen Zielzellen etwa auf das Vorhandensein des von mir charakterisierten HLA-B*4001-kreuzreaktiven TCRs, beispielsweise durch durchflusszytometrische Untersuchung mit TCR V β -Antikörper oder TCR-subfamilienspezifische PCR, untersucht werden. Interessant wird es auch sein, die Häufigkeit solcher allo-HLA-B*4001-reaktiven T-Zellen im NLV-spezifischen T-Zellrepertoire von HLA-B*4001-negativen CMV-Virusträgern zu bestimmen.

Bei der Stimulation von primären T-Zellen des Spenders MD mit der autologen pp65-exprimierenden mLCL gelang es, **CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen spezifisch für CMV-Epitope mit bisher noch nicht charakterisierten HLA-Restriktionen** herzustellen. Die Peptidspezifität der T-Zellklone konnte mit Hilfe einer pp65-Peptidbank aus überlappenden 15 Aminosäure langen CMV-Peptiden bestimmt werden. Der CD4⁺ T-Zellklon MD-21 erkannte dabei das pp65-Peptid KVYLESFCEDVPSGK (kurz KVYL), der CD8⁺ T-Zellklon MD-25P das Peptid RIPHERNGFTVL (kurz RPH). CD4⁺ T-Zellen, die spezifisch für das 15 Aminosäuren lange Peptid KVYLESFCEDVPSGK waren, wurden bereits von Giuseppina Li Pira und ihren Kollegen bei zwei CMV-spezifischen Spendern beschrieben (Li Pira et al., 2004). Die Epitoperkennung wurde als HLA-DRB1-15-restringiert beschrieben, allerdings waren die Spender bezüglich HLA-Klasse-II nur in HLA-DR typisiert und die HLA-Restriktion wurde lediglich aus dem Reaktionsmuster verschiedener Spender-PBMCs mit verschiedenen HLA-Typen ermittelt. Da man jedoch nicht erwarten kann, dass alle Spender eines bestimmten HLA-Typs gegen ein entsprechendes Peptid reagieren, ist eine solche Schlussfolgerung recht unsicher. Die von mir gewählte Methode, einen T-Zellklon zu generieren und diesen dann auf die Erkennung partiell HLA-kompatibler Zielzellen zu testen, ist demgegenüber weit verlässlicher. Meine Analysen zur KVYL-spezifischen Reaktivität haben gezeigt, dass nur pp65-exprimierende mLCLs erkannt werden, die die HLA-Moleküle DRB1-11 und DQB1-03 tragen (Abbildung 5-7, C und D, Seite 53). Es ist also zum einen möglich, dass die Spender der KVYL-spezifischen T-Zellen der Li-Pira-Studie ebenfalls das HLA-DQB1-03-Molekül tragen und das KVYL Epitop, wie der T-Zellklon MD-21, DQB1-03-restringiert erkennen. Zum anderen kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass Li Pira und ihre Kollegen eine Reaktivität gegenüber einem anderen Epitop beobachtet haben, dessen minimale Aminosäuresequenz zufällig ebenfalls innerhalb des KVYL-15-mers liegt und dessen Erkennung wirklich über HLA-DRB1-15 restringiert ist. Auch die pp65-Peptidsequenz RIPHERNGFTVL wurde bereits in früheren Studien als immunogen beschrieben. Longmate und seine Kollegen haben bereits 2001 das pp65-Peptid RIPHERNGFTVL (11-mer) als HLA-B*0702-restringiertes Antigen beschrieben, das von CD8⁺ T-Zellen erkannt wird (Longmate et al., 2001). Zusätzlich wurde das innerhalb desselben Proteinfragments enthaltene 9-mer HERNGFTVL als HLA-B40-restringiertes CD8-Epitop definiert (Kondo et al., 2004). Der von mir generierte CD8⁺ T-Zellklon MD-25P erkennt nur das RPH-11-mer, jedoch nicht das überlappende Peptid HERNGFTVLC (10-mer) (Abbildung

5-7B, Seite 53). Der Spender dieser CMV-spezifischen T-Zellen MD ist außerdem HLA-B*0702- und auch HLA-B40-negativ. Es liegt also eine bisher noch nicht beschriebene Reaktivität gegenüber dem RPH-Peptid mit einer neuen HLA-Restriktion vor. Meine Analysen zur CMV-spezifischen Reaktivität des MD-25P-T-Zellklons gegenüber allogenen Zielzellen haben gezeigt, dass nur pp65-exprimierende Zielzellen erkannt werden, die positiv für die HLA-Allele HLA-A11, HLA-B*1501 und HLA-C*07 sind (Abbildung 5-7, A und B, Seite 53). Da der Aminosäuresequenz die charakteristischen Ankermotive für eine Bindung an die HLA-A11- und HLA-B*1501-Moleküle fehlen, ist eine Restriktion des RPH-Peptids über das HLA-Molekül HLA-C*07 sehr wahrscheinlich. Der in früheren Arbeiten hergestellte und charakterisierte CD4⁺ T-Zellklon F46-17 (Wiesner et al., 2005), dessen HLA-Restriktion in meiner Promotionsarbeit nochmals genauer untersucht wurde, erkennt ebenfalls das Peptid RIPHERNGFTVL (11-mer). Der F46-17-Klon erkennt nur pp65-positive mLCLs, die die HLA-Allele HLA-DRB1-13 oder HLA-DQ6 tragen (Abbildung 5-4F, Seite 50). Da im Labor keine Zellen vorhanden waren, die nur für eines der beiden Allele positiv sind, konnte die HLA-Restriktion leider nicht weiter eingeschränkt werden. Insgesamt ist somit auffällig, dass innerhalb des 15-mer-Peptids RPH verschiedene CMV-T-Zellepitope liegen, die von mindestens vier verschiedenen HLA-Molekülen präsentiert werden können. Dies ist eine ungewöhnliche Ballung von T-Zellepitopen, die in dieser Form bisher meines Wissens nicht beobachtet wurde.

Die TCR α - und β -Ketten der hergestellten pp65- und IE-1-spezifischen T-Zellklone, mit Ausnahme der Ketten des alloreaktiven T-Zellklons F36-30, wurden in den retroviralen Vektor MP71Gpre eingefügt. Für den retroviralen Transfer auf sekundäre Zellen wurden für erste Untersuchungen allerdings nur eine **Auswahl von vier pp65-spezifischen HLA-Klasse-I-restringierten TCRs** verwendet. Meine Hypothese war, dass antigenspezifische TCR-transgene T-Zellen unabhängig von der HLA-Restriktion des TCRs hergestellt werden können, obwohl bisher hauptsächlich der Transfer von HLA-A*0201-restringierten tumorspezifischen TCRs untersucht wurde (Stauss et al., 2007). Es wurden also zwei NLV-spezifische TCRs (HLA-A*0201-restringiert), ein YSE-spezifischer (HLA-A*0101-restringiert) und ein IPS-spezifischer (HLA-B*3501-restringiert) TCR ausgewählt. Einer dieser TCRs, NLV2, wurde mit identischer Sequenz bei NLV-spezifischen T-Zellen der zwei HLA-A*0201-positiven Spender JG und RZ gefunden (Tabelle 5-II, Seite 58). Dies bestätigt die frühere Beschreibung dieses TCRs oder seiner β -Kette als "*public*" (Price et al., 2005; Trautmann et al., 2005; Venturi et al., 2008; Weekes et al., 1999). Solche "*public TCRs*" könnten gerade für die Herstellung allogener TCR-transgener T-Zellen zum adoptiven Transfer besonders geeignet sein, da sie im T-Zellrepertoire von verschiedenen Spendern mit unterschiedlichem HLA-Hintergrund vorhanden sind und so die Wahrscheinlichkeit einer Alloreaktivität sinkt. Der zweite NLV-spezifische TCR, NLV3, wurde bisher noch nicht beschrieben und wurde von mir nur bei NLV-spezifischen T-Zellen des Spenders JG vorgefunden (Tabelle 5-II, Seite 58). Es handelt sich hier möglicherweise um einen "*private TCR*". Weil dieser TCR eine ungewöhnlich kurze CDR3 α -Region aufweist, ist es interessant, zukünftig die Struktur des

entsprechenden TCR-Peptid-HLA-Komplexes zu untersuchen. Die beiden anderen verwendeten TCRs, IPS und YSE, wurden bisher ebenfalls noch nicht charakterisiert. Neben den Untersuchungen von Rebekah Brennan und ihren Kollegen zu IPS-spezifischen TCRs (Brennan et al., 2007), deren Sequenzen sich von den von mir definierten stark unterscheiden, ist bisher allerdings noch gar nichts über die TCR-Verwendung von pp65-spezifischen, HLA-A*0101- und -B*3501-restringierten T-Zellen bekannt. Die momentanen Erkenntnisse reichen deshalb nicht aus, um die TCRs IPS und YSE als "*public*" oder "*private*" zu klassifizieren.

Ich konnte zeigen, dass der **retrovirale Transfer** von jedem der vier CMV-spezifischen TCRs zu TCR-transgenen T-Zellen führt, die ein breites Spektrum an erwünschten Funktionen in der Antwort auf das endogen prozessierte CMV-Antigen aufweisen. Durch die Stimulation mit autologen B-Zellen, die das CMV-Antigen pp65 endogen prozessieren, konnten die TCR-transgenen T-Zellen spezifisch expandiert und innerhalb der T-Zellkultur angereichert werden (Abbildung 5-16, Seite 63 und Tabelle 5-III, Seite 64), was das enorme proliferative Potential dieser Zellen nach Antigenkontakt verdeutlicht. Diese Eigenschaft ist für eine erfolgreiche Kontrolle der CMV-Infektion oder Reaktivierung *in vivo* besonders wichtig. Der Anstieg an CMV-TCR-exprimierenden T-Zellen innerhalb der Kultur war mit einem Anstieg der antigenspezifischen Effektorfunktionen, wie Zytotoxizität und Zytokinfreisetzung, in der gleichen Größenordnung verbunden (Abbildung 5-18, Seite 66 und Abbildung 5-20, Seite 68). Dies zeigt, dass die Funktionalität dieser TCR-transgenen T-Zellen nach Antigenkontakt und antigenspezifischer Proliferation *in vitro* vollständig erhalten bleibt. Im Einklang mit diesen Beobachtungen ist auch, dass die Färbeintensität der Peptid/HLA-multimerpositiven Populationen im Stimulationsverlauf stabil bleibt (Abbildung 5-17, Seite 65) und die funktionelle Kapazität der multimerpositiven Zellen sogar anzusteigen scheint (Abbildung 5-19, Seite 67). Darüber hinaus war keine Stimulation, keine Zellsortierung oder -depletion notwendig, um T-Zellen zu erhalten, die bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt, nämlich 6 Tage nach TCR-Transfer, eine sehr überzeugende antigenspezifische Reaktivität zeigen (Abbildung 5-14, Seite 61).

Diese Ergebnisse erwecken die Vorstellung, dass ein **einfaches Protokoll**, das den TCR-Transfer in PBMCs ohne weitere Expansions- und Selektionsschritte beinhaltet, **für die Herstellung von CMV-spezifischen TCR-transgenen T-Zellen** für den unmittelbaren Einsatz in T-Zell-Transfertherapien geeignet ist. Es sollte allerdings darauf geachtet werden, dass die Gesamtzahl der allogenen Zellen, die dem Patienten verabreicht werden, niedrig genug ist, beispielsweise unter 10^6 Zellen/kg bei Spender/Empfänger-Paaren mit aufeinander abgestimmten HLA-Typen (Rizzieri et al., 2009), um die Wahrscheinlichkeit einer *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) zu minimieren. In der TCR-transduzierten T-Zellpräparation könnten nämlich alloreaktive oder ursprünglich tolerante autoreaktive T-Zellen vorhanden sein. Solche potentiell schädlichen T-Zellen könnten durch die anti-CD3-Behandlung vor der Transduktion oder durch die Tatsache, dass der transgene CMV-spezifische TCR auf einer solchen Zelle koexprimiert wird und sein Antigen erkennt, aktiviert werden. Wenn die T-Zelltherapie jedoch früh genug durchgeführt wird,

sind geringe Mengen an CMV-antigenspezifischen T-Zellen wahrscheinlich ausreichend, um eine Erkrankung abzuwenden (Cobbald et al., 2005). Ich halte es außerdem für wahrscheinlich, dass die antigengetriebene T-Zellexpansion im CMV-infizierten HSCT-Patienten, die möglicherweise durch Lymphopenie begünstigt wird (Boeckh et al., 2003), für die Entstehung einer ausreichenden Zahl an spezifischen Effektor-T-Zellen mindestens genauso effektiv ist wie eine weitere Anreicherung *in vitro*. Der beträchtliche Anteil an CMV-TCR-transgenen T-Zellen, die für die *central memory*-Marker CCR7 und CD62L positiv waren und nach Antigenkontakt *in vitro* positiv blieben, deutet zusätzlich darauf hin, dass solche TCR-transgenen T-Zellen *in vivo* ein effektives CMV-spezifisches Gedächtnis bilden könnten.

Generell sind auch **alternative Strategien** denkbar, um **CMV-spezifische T-Zellen für die adoptive Therapie nach D-/R+ HSCT** verfügbar zu machen. CMV-spezifische T-Zellen könnten beispielsweise direkt von einem dritten CMV-positiven Spender hergestellt werden. In diesem Zusammenhang wurden bei organtransplantierten Patienten durch die Verabreichung von EBV-spezifischen T-Zellen, die von einem weiteren, an der Organtransplantation unbeteiligten Spender hergestellt wurden, sehr gute therapeutische Effekte erzielt (Haque et al., 2007). Die allogenen T-Zellen könnten jedoch durch das Immunsystem des Patienten, welches nach einer Stammzelltransplantation den Zellen des HSCT-Spenders entspricht, sehr schnell abgestoßen werden, was einen antiviralen Langzeit-Schutz verhindern könnte. Deshalb sind virusspezifische T-Zellen, die vom HSCT-Spender hergestellt werden, für die adoptive Therapie nach einer Stammzelltransplantation zu bevorzugen.

Eine **andere Alternative zum CMV-TCR-Transfer** wäre die primäre Aktivierung und Expansion der seltenen naiven CMV-spezifischen T-Zellen des HSCT-Spenders *in vitro*. Bemerkenswerterweise war es mit einem kleinen Teil CMV-negativer Spender möglich, durch die *in vitro*-Aktivierung von naiven T-Zellen CMV-spezifische T-Zellen herzustellen (Kleihauer et al., 2001; Kondo et al., 2004; Szmania et al., 2001). Ich halte es jedoch für sehr schwierig, diese Befunde in durchführbare klinische Protokolle umzuwandeln, da die Vorläuferhäufigkeit – abgeschätzt aus allgemeinen Überlegungen zur TCR-Diversität – von naiven CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen höchstwahrscheinlich nicht höher als 1 in 10⁶ Zellen ist (Arstila et al., 1999). Daher ist der Transfer von CMV-spezifischen TCRs die einfachere und effizientere Methode für die adoptive Therapie von CMV-Komplikationen nach HSCT mit CMV-negativen Spendern.

Durch die Verwendung von CMV-spezifischen TCRs mit verschiedenen HLA-Restriktionen kann die **Abdeckung der Bevölkerung** optimiert werden. Mit den ausgewählten HLA-A*0101-, HLA-A*0201- und HLA-B*3501-restringierten CMV-TCRs können mindestens 70% der Europäer abgedeckt werden, da HLA-A*0201 der häufigste und HLA-A*0101 der zweithäufigste HLA-Allotyp sind. Natürlich ist eine Erweiterung dieses CMV-TCR-Repertoires, um zusätzliche HLA-Allotypen einzuschließen, äußerst wünschenswert.

Außerdem wäre es vorteilhaft für die Therapie von CMV-assoziierten Erkrankungen, neben pp65-spezifischen T-Zellen, auch T-Zellen spezifisch für das ebenfalls immundominante **CMV-Antigen IE-1** zu verabreichen. Diese beiden Proteine sind die wichtigsten Zielantigene der CMV-spezifischen T-Zellantwort (Elkington et al., 2003; Kern et al., 1999; McLaughlin-Taylor et al., 1994; Sylwester et al., 2005; Wills et al., 1996) und sie besitzen unterschiedliche Expressionsprofile während der CMV-Infektion. Das Phosphoprotein pp65 ist eine Hauptkomponente des viralen Teguments und damit Bestandteil des Virions. Es kann deshalb ohne Neusynthese unmittelbar nach Infektion prozessiert und auf HLA-Klasse-I-präsentiert werden. Außerdem wird pp65 vor allem während der lytischen Phase zur Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln exprimiert. Der sehr früh und während des gesamten Replikationszyklus exprimierte virale Transkriptionsfaktor IE-1 hingegen ist sowohl während der latenten wie auch der lytischen Phase von CMV aktiv und wird schon sehr früh als Antigen präsentiert (Arrode et al., 2000). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Proteine von unterschiedlichen Zelltypen an verschiedenen Orten im Körper exprimiert werden können. Es wurde auch gezeigt, dass vor allem das Vorhandensein IE-1-spezifischer T-Zellen CMV-assoziierte Erkrankungen sehr effektiv kontrolliert (Bunde et al., 2005; Nickel et al., 2009). In meiner Arbeit ist es gelungen, auch IE-1-spezifische T-Zellklone herzustellen, die IE-1-spezifischen TCRs zu charakterisieren sowie retrovirale Vektoren zum TCR-Transfer herzustellen. Leider war die Analyse von IE-1-TCR-transgenen T-Zellen im Rahmen meiner Promotion nicht mehr möglich. Diese Vorarbeiten bilden allerdings einen soliden Ausgangspunkt für die Charakterisierung IE-1-TCR-transgener T-Zellen zum Einsatz in CMV-spezifischen T-Zelltransfertherapien.

Für eine lang andauernde Aufrechterhaltung transferierter CD8⁺ T-Zellen scheint die Anwesenheit von **CD4⁺ T-Zellen** wichtig zu sein (Peggs et al., 2003; Walter et al., 1995). Diese sezernieren Wachstumsfaktoren wie IL-2 und vermitteln kostimulatorische Signale, etwa über die CD40/CD40L-Wechselwirkung, was wiederum die Antigenpräsentation auf APCs erhöht sowie deren kostimulatorische Eigenschaften verbessert (Sarawar et al., 2001; Schoenberger et al., 1998). Walter und seine Kollegen konnten zeigen, dass infundierte zytotoxische T-Zellen bei solchen Patienten weniger lange erhalten blieben, bei denen keine CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen nachweisbar waren (Walter et al., 1995). Dagegen führt die gemeinsame Infusion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu einer starken und lang anhaltenden virusspezifischen Zytotoxizität (Heslop et al., 1996; Walter et al., 1995). Der ausschließliche Transfer von CD4⁺ T-Zellen führte beeindruckenderweise zu einer Expansion von CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, wenn der Patient bereits Vorläuferzellen besaß (Einsele et al., 2002). Auch neuere Studien unterstreichen die Rolle der CD4⁺ T-Zellen bei der Etablierung eines funktionierenden T-Zellgedächtnisses (Bevan, 2004; Haque et al., 2007; Janssen et al., 2003; Shedlock und Shen, 2003; Sun und Bevan, 2003). CD4⁺ T-Zellen können auch eine direkte antivirale Wirkung haben, indem sie Zytokine wie IFN- γ und TNF- α freisetzen und zytotoxisch auf virusinfizierte Zellen wirken (Appay et al., 2002; Savoldo et al., 2002). Die mangelnde Rekonstitution der CD4⁺ T-Zellantwort nach einer HSCT ist auch

entscheidend für die Reaktivierung von CMV und die Entwicklung CMV-assoziiierter Erkrankungen (Widmann et al., 2008). Um dieser Anforderung an eine wirksame CMV-spezifische T-Zelltherapie gerecht zu werden, habe ich auch CMV-spezifische CD4⁺ T-Zellklone hergestellt und analysiert. Die pp65-spezifischen TCRs, welche die Epitope KVYL (HLA-DRB1-11- oder HLA-DQB1-03-restringiert) und RPHE (HLA-DRB1-13- oder HLA-DQB1-06-restringiert) erkennen, wurden charakterisiert und die TCR α - und β -Ketten in den retroviralen Vektor MP71Gpre zum Gentransfer eingebracht. Während meiner Doktorarbeit war es leider nicht mehr möglich, den Transfer dieser HLA-Klasse-II-restringierten TCRs auf sekundäre Zellen und die CMV-spezifische Reaktivität der resultierenden CMV-TCR-transgenen T-Zellen zu untersuchen. In weiterführenden Projekten wird es allerdings interessant sein, den Gentransfer dieser CD4-TCRs zur Herstellung CMV-spezifischer T-Zellen für eine effektive adoptive Immuntherapie zu evaluieren. Ich konnte im Rahmen meiner Doktorarbeit jedoch zeigen, dass beim Transfer HLA-Klasse-I-restringierter TCRs auch CMV-spezifische CD4⁺ T-Zellen entstehen können (Abbildung 5-13, Seite 60). Diese TCR-transgenen CD4⁺ T-Zellen bleiben auch während der antigenspezifischen Stimulation erhalten, so beispielsweise nach Transfer der NLV-spezifischen TCRs NLV2 und NLV3, und können teilweise sogar vermehrt werden, wie nach Transfer des YSE-TCRs (Abbildung 5-16E, Seite 63). Dies zeigt, dass diese Zellen in der Lage sind, nach Antigenkontakt zu proliferieren. Es ist anzunehmen, dass diese TCR-transgenen Zellen pp65 zwar HLA-Klasse-I-restringiert erkennen, aber höchstwahrscheinlich in der Lage sind, eine für CD4⁺ T-Zellen typische Funktion auszuüben. So konnte beispielsweise bereits sechs Tage nach Transfer der NLV-spezifischen TCRs NLV2 und NLV3 die antigenspezifische Freisetzung von IL-2 in der TCR-transduzierten Gesamtkultur nachgewiesen werden (Abbildung 5-14B, Seite 61). Auch nach drei antigenspezifischen Stimulationsrunden wurde von den YSE-TCR-transduzierten T-Zellen, innerhalb derer ja auch CD4⁺ TCR-transgene T-Zellen angereichert wurden, weiterhin IL-2 freigesetzt (Abbildung 5-18C, Seite 66). Um die CMV-spezifische Reaktivität der CD4⁺ T-Zellen, die einen HLA-Klasse-I-restringierten TCR auf ihrer Oberfläche tragen, genauer zu charakterisieren, sind allerdings weiterführende Experimente mit reinen CD4⁺ TCR-transgenen T-Zellpopulationen notwendig. Es ist also denkbar, dass sich auch durch Gentransfer von HLA-Klasse-I-restringierten CMV-TCRs CMV-spezifische CD4⁺ T-Zellen herstellen lassen, die sich für die antivirale T-Zelltherapie eignen.

Dass die HLA-Klasse-I-restringierten TCRs NLV2, NLV3 und YSE mittels Färbung mit den entsprechenden Peptid/HLA-Multimeren auch auf CD4⁺ T-Zellen sowie den CD8-negativen J76-Zellen nachweisbar waren, weist auf die **Unabhängigkeit der Peptid/HLA-Bindung vom CD8-Korezeptor** hin. Die Multimerfärbung des IPS-TCRs war dagegen abhängig von der CD8-Expression. Verschiedene Faktoren können die Avidität der Interaktion des TCRs mit Peptid/HLA-I-Komplexen beeinflussen, darunter die Dichte und die Stabilität des TCR/HLA-I-Komplexes selbst (Alam et al., 1999; Fahmy et al., 2001; Gascoigne et al., 2000), die Kolokalisation von TCR und CD8 in der immunologischen Synapse (Cawthon und Alexander-Miller, 2002; Fahmy et al., 2001; Grakoui et al., 1999; Monks et al., 1998) sowie die Bindung des

CD8-Moleküls (Garcia et al., 1996). Während bekannt ist, dass CD4-Moleküle die Stabilität von Peptid-HLA-TCR-Interaktionen nicht erhöhen (Davis et al., 1998; Xiong et al., 2001), ist die Rolle von CD8 noch immer kontrovers. Strukturelle und kinetische Analysen der CD8-Bindung an das HLA-Klasse-I-Molekül haben allerdings die verantwortlichen molekularen Motive geklärt (Gao et al., 2002; Wyer et al., 1999). Die Affinität der HLA-I-CD8-Bindung ist relativ schwach ($\sim 130 \mu\text{M}$) im Vergleich zur Affinität der TCR-Bindung an den Peptid/HLA-Komplex ($\sim 1\text{-}10 \mu\text{M}$) (Matsui et al., 1994; Moody et al., 2001; Wyer et al., 1999), was sicher stellt, dass nur Zellen, die den passenden Peptid/HLA-Komplex präsentieren, erkannt werden. Es ist allerdings erstaunlich, dass drei von vier untersuchten CMV-spezifischen TCRs das entsprechende Peptid/HLA-Multimer CD8-unabhängig binden (Abbildung 5-12, Seite 59, Abbildung 5-13, Seite 60). Nur die Antigenbindung des IPS-TCRs ist von der CD8-Expression abhängig (Abbildung 5-12, Seite 59, Abbildung 5-13, Seite 60). Die Untersuchungen von David Price und seinen Kollegen weisen darauf hin, dass die T-Zellavidität das CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellrepertoire formt und zur klonalen Dominanz von hochaffinen TCRs führt, deren Multimerbindung unabhängig von CD8 ist (Price et al., 2005). Bei drei von acht Spender waren innerhalb der dominanten NLV-spezifischen T-Zellpopulation auch T-Zellen, die die gleiche oder eine sehr ähnliche TCR β -Kette wie die des NLV2-TCRs verwendeten. Möglicherweise gilt diese Beobachtung auch für andere Peptid/HLA-Spezifitäten, wie die von mir untersuchte Spezifität gegen das HLA-A*0101-restringierte Epitop YSE. Diese CD8-Unabhängigkeit der Antigenerkennung könnte den therapeutischen Einsatzbereich von TCRs erweitern, wie bereits oben beschrieben.

CMV-spezifische TCR-Gene wurden schon in früheren Experimenten einer niederländischen Arbeitsgruppe kloniert und **auf T-Zellen übertragen** (Heemskerk et al., 2007; van der Veken et al., 2006; van Lent et al., 2007). Diese Studien haben gezeigt, dass es möglich ist, HLA-B7-restringierte (van der Veken et al., 2006) und HLA-A2-restringierte (Heemskerk et al., 2007; van Lent et al., 2007) pp65-TCRs auf $\gamma\delta$ T-Zellen (Heemskerk et al., 2007; van der Veken et al., 2006), $\alpha\beta$ T-Zellen (Heemskerk et al., 2007) oder *in vitro*-differenzierte hämatopoetische Vorläuferzellen (van Lent et al., 2007) zu transferieren. Die TCR-transgenen Zellen erkannten pp65-peptidbeladene Zielzellen (Heemskerk et al., 2007; van der Veken et al., 2006; van Lent et al., 2007) oder mit pp65 transduzierte LCLs (van der Veken et al., 2006; van Lent et al., 2007). In diesen Untersuchungen diente CMV als Modellspezifität, um die Prinzipien des TCR-Transfers zu etablieren. Mit dem Ziel, eine CMV-spezifische T-Zelltherapie im HSCT-Kontext zu entwickeln, habe ich diese früheren Ergebnisse hinsichtlich folgender Punkte erweitert: Es wurden CMV-spezifische TCRs, die durch die häufigen HLA-Allele A*0101 und B*3501 restringiert sind, charakterisiert und transferiert. Es wurde eine vereinfachte Methode des TCR-Transfers verwendet, die ohne Zellsortierung und Markergene in den transduzierten Zellen auskam. Der TCR-Transfer wurde mit einer größeren Anzahl an PBMC-Spendern durchgeführt und die TCR-transgenen T-Zellen wurden gegenüber Zielzellen mit verschiedenen HLA-Typen getestet. Im Einklang mit dem therapeutischen Ziel wurden CMV-negative Spender verwendet. Dadurch kann

auch ausgeschlossen werden, dass CMV-spezifische T-Zellen aus dem T-Zellgedächtnis des Spenders zu den beobachteten Effekten beitragen. Zudem habe ich gezeigt, dass CMV-spezifische T-Zellen durch die wiederholte Stimulation mit endogen prozessiertem Antigen spezifisch und kontinuierlich expandiert werden.

Miriam Heemskerk und ihre Kollegen hatten auch beschrieben, dass sich verschiedene CMV-spezifische TCRs, die das immundominante HLA-A*0201-restringierte Epitop NLV erkennen, signifikant im Hinblick auf die Effizienz der Übertragung der CMV-spezifischen Zytotoxizität auf PBMC-Kulturen unterscheiden (Heemskerk et al., 2007). Diese Beobachtung suggeriert, dass nur manche CMV-spezifischen TCRs für die klinische Anwendung geeignet sind. In meinen TCR-Transfer-Experimenten konnte ich ebenfalls verschiedene Oberflächenexpressionsniveaus beobachten (Abbildung 5-12, Seite 59; Abbildung 5-13, Seite 60). Die TCR-Expressionsniveaus schienen allerdings von der HLA-Restriktion abzuhängen: die zwei HLA-A*0201-restringierten TCRs, die das Epitop NLV erkennen, waren stärker exprimiert als die HLA-A*0101- und HLA-B*3501-restringierten TCRs. Dieser Effekt war sowohl in primären T-Zellen wie auch in den TCR-defizienten J76-Zellen zu sehen und scheint deshalb von den "intrinsischen Eigenschaften" (Heemskerk et al., 2007) der TCRs abzuhängen. Zusätzlich wurde ein recht geringer Unterschied in den Expressionsniveaus zwischen den beiden HLA-A*0201-restringierten TCRs nur in primären T-Zellen, nicht jedoch in J76-Zellen beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass eine Interferenz durch endogene TCRs hier eine Rolle spielen könnte. Trotz dieser Unterschiede sehr früh nach TCR-Transfer glichen sich bemerkenswerterweise, aus nicht bekannten Gründen, die Oberflächenexpression wie auch die spezifische Funktion der unterschiedlichen TCRs verschiedener HLA-Restriktion nach wiederholter antigenspezifischer Stimulation an (Abbildung 5-16C, Seite 63; Abbildung 5-18, Seite 66; Abbildung 5-19, Seite 67). Möglicherweise sind die antigenspezifischen Zellkulturbedingungen (T-Zell:Stimulatorzell-Verhältnis von 4:1) dafür verantwortlich, dass der Anteil TCR-transgener T-Zellen sich bei 20-30% der Kultur einpendelte. Weil die niedrigen Transduktionsraten des IPS-TCRs und des YSE-TCRs durch eine stärkere antigengetriebene Anreicherung kompensiert wurden, nehme ich an, dass alle vier untersuchten TCRs beim Einsatz in der adoptiven T-Zelltherapie ähnlich wirksam sein werden.

Meine Untersuchungen zum TCR-Transfer wurden mit nicht modifizierten TCR-Kettengen durchgeführt. In der Vergangenheit wurden **Modifikationen des TCRs** für eine höhere Oberflächenexpression oder eine reduzierte TCR-Kettenfehlpaarung erfolgreich verwendet, beispielsweise die Murinisierung der konstanten TCR-Regionen, die Fusion an CD3 ζ , oder die Insertion von Cysteinen, um zusätzliche Cystinbrücken zwischen den transduzierten α - und β -Ketten einzufügen (Uckert und Schumacher, 2009). Diese Modifikationen haben jedoch potentielle Nachteile, wie zum Beispiel eine veränderte TCR-Signaltransduktion oder das Einbringen von immunogenen Proteinsequenzen. Solche TCR-Modifikationen wurden oft für TCRs verwendet, die Tumor- bzw. Autoantigene erkennen (Uckert und Schumacher, 2009). Eine Optimierung solcher TCRs ist vielleicht notwendig, weil ein ausgebildetes, funktionelles T-Zellgedächtnis gegen diese

Antigene nicht existiert oder nicht zugänglich ist. Im Gegensatz dazu sind ein virusspezifisches, funktionelles T-Zellgedächtnis und damit TCRs, die ihr virales Antigen mit hoher Avidität erkennen, leicht verfügbar. Es bleibt allerdings das Risiko von gefährlichen Kreuzreaktivitäten TCR-transgener T-Zellen aufgrund von zufällig koexprimierten allo- oder autoreaktiven endogenen TCRs, oder wegen der Ausbildung einer neuen Spezifität gegenüber Allo- oder Autoantigenen durch Kreuzpaarung der eingebrachten und endogenen TCR-Ketten. Um die Wahrscheinlichkeit solcher Kreuzpaarungen zu senken, kann eine vorsichtige Modifikation der TCRs in Betracht gezogen werden. Vor ihrem Einsatz in der Therapie sollten unmodifizierte TCRs nach Transfer in primäre T-Zellen hinsichtlich ihrer Kreuzreaktivität oder ihres Kreuzpaarungspotentials extensiv getestet werden. Um die Charakterisierung der Kreuzpaarungswahrscheinlichkeit zu erleichtern, könnten statt Gesamt-PBMCs spezifische T-Zellen mit einem definierten endogenen TCR-Repertoire als Empfängerzellen für den TCR-Transfer verwendet werden (Heemskerk et al., 2007; Heemskerk et al., 2004; van Loenen et al., 2009). Mit den CMV-TCRs transduzierte EBV-spezifische T-Zellen hätten beispielsweise den zusätzlichen Vorteil eines simultanen Schutzes gegen beide diese HSCT-relevanten Pathogene (Moss und Rickinson, 2005). Alternativ oder zusätzlich könnten als Sicherheitsmechanismus beispielsweise Antikörperepitope in die Ketten der transduzierten TCRs eingebracht werden, um TCR-transgene T-Zellen im Fall von schädlichen Nebenwirkungen im Patienten mit Hilfe des entsprechenden Antikörpers wieder eliminieren zu können (Kieback et al., 2008).

Insgesamt konnte ich also CMV-spezifische TCRs von einer Reihe von HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-restringierten CMV-spezifischen T-Zellklonen charakterisieren. Die aus dem T-Zellgedächtnis CMV-positiver Spender isolierten Klone erkannten die endogen prozessierten CMV-Antigene pp65 und IE-1 sehr effizient. Ich habe gezeigt, dass alle vier untersuchten HLA-Klasse-I-restringierten, pp65-spezifischen TCRs verwendet werden können, um schnell CMV-TCR-transgene T-Zellen herzustellen, die mit einem Arsenal an spezifischen antiviralen Funktionen ausgestattet sind. Ich glaube, dass diese TCR-transgenen T-Zellen als Kandidaten für eine erfolgreiche klinische Anwendung in HSCT-Patienten mit einem CMV-negativen Spender geeignet sind, also einer Situation von beträchtlicher und wahrscheinlich sogar noch steigender klinischer Wichtigkeit.

6.2 HHV-6-spezifische T-Zellen

In Situationen der Immunsuppression, wie etwa nach einer Knochenmarks- oder Organtransplantation, kommt es in etwa 40-50% der Fälle zu einer Reaktivierung von HHV-6B (Zerr, 2006). Mehr als die Hälfte dieser Patienten erkrankt dadurch ernsthaft (Hentrich et al., 2005) mit Symptomen wie Enzephalitis (Drobyski et al., 1994; Singh und Paterson, 2000), interstitielle Pneumonitis (Cone et al., 1993) und Knochenmarksunterdrückung (Carrigan und Knox, 1994). Wie bereits oben beschrieben, hat sich der Transfer von herpesvirusspezifischen T-Zellen als äußerst wirksam für die Prophylaxe und Therapie von herpesviralen Komplikationen erwiesen (Moss und

Rickinson, 2005). Leider ist es allerdings momentan nicht möglich, HHV-6-spezifische T-Zellen für den adoptiven Transfer *in vitro* herzustellen, da die Antigene und Epitope der HHV-6-spezifischen T-Zellantwort bisher nicht bekannt sind. Das zweite Projekt meiner Doktorarbeit befasste sich deshalb mit der Charakterisierung von ersten Antigenen und CD8-T-Zellepitopen der HHV-6-spezifischen Immunantwort. Ziel dabei war es auch, zu evaluieren, ob solche Zellen aus dem T-Zellgedächtnis von gesunden HHV-6-Virusträgern isolierbar und für eine adoptive T-Zelltherapie von Patienten, die an HHV-6-assoziierten Erkrankungen leiden, geeignet sind. Dazu wurden 30 mögliche HLA-Klasse-I-restringierte Peptidepitope, die in ihrer Aminosäuresequenz konservierte Ankerreste für die Bindung an das entsprechende HLA-Molekül enthielten, aus den HHV-6B-Proteinen U11, U54 und U89/U90 ausgewählt, welche homolog zu den immundominanten CMV-Proteinen pp150, pp65 und IE-1 sind. Die synthetischen HHV-6B-Peptide wurden dann zur Stimulation von T-Zellen verwendet.

Ich konnte zeigen, dass HHV-6-peptidspezifische T-Zellen aus dem T-Zellgedächtnis gesunder HHV-6-positiver Spender angereichert werden können. Allerdings sind diese T-Zellen im Vergleich zu CMV- oder EBV-spezifischen T-Zellen anscheinend sehr selten. Durch ein optimiertes Stimulationsprotokoll, das vor allem die Anreicherung von T-Zellen des T_C1/T_H1-Typs fördert bzw. Zellen des T_H2-Typs unterdrückt und zu diesem Zweck die anfängliche Mitstimulation von anderen virusspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vorsieht, konnten von drei HLA-A*0201-positiven Spendern (AH, AS, RZ) HHV-6B-spezifische T-Zelllinien hergestellt werden. Die aus den oligoklonalen T-Zelllinien durch limitierende Verdünnung generierten T-Zellklone zeigten eine spezifische, HLA-A*0201-restringierte Reaktivität gegenüber jeweils einem der drei Peptide aus dem U11-Protein (GIL, MLW, SLM) bzw. einem der beiden Peptide aus dem U54-Protein (ILY, LLC). Alle drei näher untersuchten U54-spezifischen T-Zellklone, AS-15 ILY, RZ-7 ILY und AS-6 LLC, zeigten auch gegenüber endogen prozessiertem und auf 293T-Zellen präsentiertem Antigen eine spezifische IFN- γ -Freisetzung, die durch Zugabe von blockierendem anti-HLA-Klasse-I-Antikörper inhibiert werden konnte. Zusätzlich wurden HHV-6B-infizierte CD4⁺ T-Zellen von den U54-spezifischen T-Zellklonen AS-15 ILY und AS-6 LLC erkannt. Für die U11-peptidspezifischen T-Zellklone (AS-30 MLW, AS-62 GIL, RZ-24 GIL und RZ-17 SLM) konnte dagegen allerdings keine Erkennung von intrazellulär prozessiertem HHV-6B-Antigen und ebenfalls keine spezifische Reaktivität gegenüber virusinfizierten Zellen nachgewiesen werden.

Mit diesen Ergebnissen konnte ich zum ersten Mal Epitope der HHV-6-spezifischen T-Zellantwort beschreiben. Das Virus induziert also, ähnlich wie CMV, spezifische T-Zellen für die viralen Tegumentproteine. Die HHV-6-spezifischen T-Zellen sind jedoch im Vergleich zu CMV-spezifischen T-Zellen im T-Zellgedächtnis von gesunden Virusträgern scheinbar recht selten. So konnten beispielsweise durch Stimulation von frisch isolierten peripheren T-Zellen mit den HHV-6B-Peptiden und anschließender IFN- γ -ELISpot-Analyse bei mehreren HHV-6-positiven Spendern keine HHV-6B-peptidreaktiven T-Zellen nachgewiesen werden (als Beispiel siehe Abbildung 5-22, Seite 73). Die Analyse der Häufigkeit von MLW (U11, HLA-A*0201)-spezifischen und ILY (U54,

HLA-A*0201)-spezifischen T-Zellen mittels der entsprechenden Peptid/HLA-Pentamere ergab, dass diese Zellen innerhalb der primären peripheren Blutzellen seltener als 1 in 100.000 bzw. 1 in 1.000.000 sind (Abbildung 5-45, Seite 103 und Abbildung 5-46, Seite 104).

Diese niedrige Anzahl von spezifischen T-Zellen **erschwerte auch die Anreicherung** dieser Zellen durch *in vitro* Stimulation mit HHV-6B-peptidbeladenen Zellen. Die für die Anreicherung von anderen herpesvirus-spezifischen oder von den selteneren HPV-spezifischen T-Zellen im Labor bewährten Protokolle (Wiesner et al., 2005; Wiesner et al., 2008; Zentz et al., 2007) erwiesen sich für die Vermehrung von HHV-6-spezifischen Zellen als in den meisten Fällen nicht erfolgreich. Erst durch die Mitstimulation von EBV- oder CMV-spezifischen T-Zellen in der Kultur war eine solide Anreicherung von HHV-6-spezifischen T-Zellen mit unterschiedlichen Peptidspezifitäten möglich. Grundlage für dieses Stimulationsprotokoll bildete die Annahme, dass die HHV-6-spezifischen Zellen in den ersten Wochen in der *in vitro*-T-Zellkultur so selten sind, dass durch die HHV-6B-Peptidstimulation zu wenige Zellen angesprochen werden, um ein günstiges Milieu für die Proliferation von antigenspezifischen Zellen zu schaffen. Gleichzeitig könnten dabei zu viele nicht-spezifische CD4⁺ T-Zellen durch andere Mechanismen (IL-2, FKS, Erkennung von Autoantigenen durch regulatorische T-Zellen etc.) aktiviert werden, was eine Freisetzung von T_H2-Zytokinen wie IL-10 oder IL-4 zur Folge haben könnte und sich negativ auf die Proliferation der virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen auswirkt. Deshalb hielt ich es für sinnvoll, in den ersten vier Wochen der *in vitro*-Stimulation häufigere virusspezifische T-Zellen, wie etwa CMV- oder EBV-spezifische Gedächtnis-T-Zellen (je nach HLA-Typ und Virusstatus des Spenders), mitzustimulieren. Dadurch sollte ein Zytokinmilieu in der T-Zellkultur entstehen, welches sich vorteilhaft auf die Vermehrung der HHV-6-spezifischen T-Zellen auswirkt.

Die durch Stimulation mit HHV-6B-Peptiden hergestellten **U54-spezifischen T-Zellklone** zeigten ohne Ausnahme eine Reaktivität gegenüber dem endogen exprimierten Antigen (Abbildung 5-40, Seite 97). Diese Beobachtung bestätigt, dass die Peptide ILYGPLTRI und LLCGNLLIL bei der intrazellulären Prozessierung des HHV-6B-Proteins U54 entstehen und auf HLA-A*0201-Moleküle geladen werden können. Es handelt sich also wirklich um HLA-A*0201-restringierte CD8-T-Zellepitope, die bei der HHV-6-Infektion von Zellen entstehen können. Der ILY-spezifische T-Zellklon AS-15 ILY erkannte das homologe Peptid VIYGPLTRI aus dem U54-Protein des HHV-6A-Virusstamms U1102 ähnlich gut wie das HHV-6B-Peptid ILYGPLTRI; der zweite ILY-spezifische T-Zellklon RZ-7 ILY, der allerdings auch einen anderen TCR verwendete als der AS-15 ILY-Klon, erkannte dagegen das HHV-6A-Peptid weit schlechter als das HHV-6B-Peptid (Abbildung 5-38, Seite 93). Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass der HHV-6B-spezifische T-Zellklon AS-15 ILY auch HHV-6A-infizierte Zellen erkennt, dass dies aber nicht für alle gegen ILY gerichteten T-Zellen gilt. Bei der Analyse der Reaktivität der ILY-spezifischen T-Zellklone gegenüber HHV-6B (HST)- und HHV-6A (U1102)-infizierten CD4⁺ PHA-Blasten zeigte sich allerdings, dass nur der T-Zellklon AS-15 ILY, der auch eine etwas höhere Avidität gegenüber dem ILY-Peptid hat als der T-Zellklon RZ-7 ILY (Abbildung 5-38, Seite 93), eine spezifische IFN- γ -

Freisetzung nach Kokultur mit HHV-6B-infizierten Zellen aufweist (Abbildung 5-43, Seite 100). Die HHV-6A-infizierten Zellen wurden von beiden T-Zellklonen nicht erkannt. Dies könnte verschiedene Gründe haben: Eine Möglichkeit ist, dass das VIY-Peptid bei der endogenen Prozessierung des HHV-6A-U54-Proteins nicht entsteht und deshalb von den virusinfizierten Zellen nicht präsentiert wird. Ich halte dies allerdings für recht unwahrscheinlich, da sich die Peptidsequenz lediglich in den ersten beiden Aminosäuren unterscheidet und hier auch nur sehr ähnliche Aminosäuren (Valin statt Isoleucin bzw. Isoleucin statt Leucin) verwendet werden. Weiter ist denkbar, dass die Affinität des Peptids gegenüber dem HLA-A*0201-Molekül zu schwach ist, um bei physiologischen Peptidkonzentrationen eine stabile Präsentation des Peptid/HLA-Komplexes auf der Oberfläche zu ermöglichen. Die als Zielzellen eingesetzten CD4⁺ PHA-Blasten wurden *in vitro* mit den Virusstämmen HST (HHV-6B) und U1102 (HHV-6A) infiziert. Die Unterschiede der Virustypen hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften, wie etwa die Dauer eines Infektionszyklus, die unterschiedliche Morphologie der infizierten Zellen oder vielleicht andere bzw. stärker ausgeprägte Mechanismen der Immunmodulation sind jedoch nicht zu vernachlässigen. Es ist also auch möglich, dass die verwendeten *in vitro* mit HHV-6A infizierten PHA-Blasten, zum falschen Zeitpunkt als Zielzellen getestet wurden, d.h. im Unterschied zur HHV-6B-Infektion könnte das U54-Protein in dieser Infektionsphase nicht ausreichend synthetisiert worden sein. Darüber hinaus ist denkbar, dass HHV-6A-infizierte Zellen durch eine stärkere Immunmodulation durch das Virus (Lusso, 2006) zum Analysezeitpunkt für T-Zellen schwerer erkennbar waren. Eine detailliertere Untersuchung der HHV-6A-spezifischen Reaktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion könnte darüber vielleicht Klarheit liefern. Der wahrscheinlichste Grund für die ausschließliche Erkennung von HHV-6B-infizierten Zellen durch den T-Zellklon AS-15 ILY könnte jedoch sein, dass die Affinität des ILY-spezifischen TCRs gegenüber dem VIY/HLA-A*0201-Komplex zu niedrig ist, was eine Erkennung von Zellen, die endogen prozessiertes U11-Antigen präsentieren, verhindert. Im Gegensatz zu ILY/VIY ist das Peptid LLCGNLLIL im U54-Protein der HHV-6B-Virusstämme Z29 und HST wie auch des HHV-6A-Virusstamms U1102 mit identischer Sequenz enthalten (Tabelle 5-IV, Seite 71), was eine spezifische Erkennung beider Virustypen durch LLC-spezifische T-Zellen nahelegen würde. In den bisherigen Analysen konnte eine spezifische Reaktivität des T-Zellklons AS-6 LLC gegenüber HHV-6B-infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 5-43, Seite 100). Eine Erkennung von HHV-6A-infizierten Zellen wurde bisher leider noch nicht getestet. Sollte der LLC-spezifische T-Zellklon in zukünftigen Experimenten HHV-6A-infizierte Zellen erkennen, kann eine unzureichende Infektion, eine zu niedrige U54-Expression in HHV-6A-infizierten PHA-Blasten und auch eine störende Immunmodulation durch das HHV-6A-Virus ausgeschlossen werden.

Alle hergestellten und analysierten **U11-peptidspezifischen T-Zellklone** zeigten keine Reaktivität gegenüber endogen in 293T-Zellen exprimiertem Antigen (Abbildung 5-39, Seite 95). Es ist also möglich, dass die vorhergesagten T-Zellepitope bei der intrazellulären Prozessierung des HHV-6B-Proteins U11 nicht entstehen oder nicht auf HLA-Moleküle geladen werden. Bei den durch

Stimulation mit den synthetisch hergestellten Peptiden angereicherten T-Zellen würde es sich dann folglich um kreuzreaktive Gedächtnis-T-Zellen oder, was nicht so wahrscheinlich ist, um primäraktivierte naive T-Zellen handeln. Alternativ ist allerdings auch denkbar, dass das U11-Protein bzw. die U11-Proteinfragmente in 293T-Zellen nur schwach exprimiert werden, was zu einer unzureichenden Präsentation von U11-Peptiden auf den HLA-Molekülen führen könnte. Dies könnte beispielsweise auf eine inhibierende Wirkung auf die Antigenexpression oder Antigenprozessierung sowie auf toxische Eigenschaften des viralen Proteins zurückgehen. Physiologisch mit HHV-6 infizierte T-Zellen, die prinzipiell auch ein höheres HLA-Klasse-I-Expressionsniveau als 293T-Zellen haben, könnten dagegen dennoch erkannt werden, falls die Epitope bei der endogenen Prozessierung wirklich entstehen. Bei den bisherigen Analysen der Erkennung virusinfizierter CD4⁺ T-Zellen durch die U11-spezifischen T-Zellklone konnte jedoch leider keine Reaktivität gegenüber HHV-6A- oder HHV-6B-infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 5-44, Seite 101). Da die U54-spezifischen T-Zellklone AS-15 ILY und AS-6 LLC eine HHV-6-spezifische Reaktivität gegenüber virusinfizierten CD4⁺ T-Zellen zeigten, kann generell angenommen werden, dass diese Zielzellen für die Analyse der virusspezifischen Reaktivität *in vitro* geeignet sind. Es ist allerdings unklar, ob die viralen Tegumentproteine U11 und U54 in diesem artifiziiellen *in vitro*-Infektionssystem im gleichen Zeitfenster der HHV-6-Infektion und in vergleichbaren Mengen gebildet und präsentiert werden. Um diese Einflussgrößen genauer zu untersuchen, könnte beispielsweise die U11- und die U54-mRNA-Expression in den infizierten CD4⁺ PHA-Blasten im Verlauf der HHV-6-Infektion analysiert und verglichen werden. Zusätzlich könnte die Erkennung von virusinfizierten Zellen durch die U11-spezifischen T-Zellklone zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion untersucht werden. Die bisherigen Untersuchungen lassen noch keine abschließende Aussage darüber zu, ob es sich bei den von den T-Zellklonen erkannten U11-Peptiden um CD8-T-Zellepitope handelt, die bei der endogenen Antigenprozessierung und -präsentation entstehen.

Wie sich durch meine Untersuchungen gezeigt hat, sind T-Zellen spezifisch für die ausgewählten HHV-6B-Peptide im T-Zellgedächtnis gesunder Virusträger sehr selten. Die zur Stimulation und Analyse verwendeten Peptide wurden aufgrund von konservierten HLA-Bindemotiven vorhergesagt. Es wurden dazu die HHV-6B-Proteine U11, U54 und U89/90 ausgewählt. Grundlegend dafür war die Tatsache, dass diese Proteine homolog zu den CMV-Proteinen pp150, pp65 und IE-1 sind. Ich habe außerdem angenommen, dass diese HHV-6-Proteine, ähnlich wie die entsprechenden CMV-Proteine, Zielantigene der CD8⁺ T-Zellantwort darstellen könnten. Diese Hypothese konnte ich zumindest teilweise beweisen. Sie war plausibel, weil CMV und HHV-6 beide zu den β -Herpesviren zählen und sich in einigen Eigenschaften recht ähnlich sind. Beide Viren besitzen beispielsweise einen relativ breiten Zelltropismus und die Infektion führt zu einem zytopathischen Effekt, der mit einer starken Vergrößerung der infizierten Zellen einhergeht. Auch die Organisation des HHV-6-Genoms und die Regulation der viralen Genexpression ist der des CMV recht ähnlich (De Bolle et al., 2005). Es ist allerdings wahrscheinlich, dass sich die HHV-6-

spezifische T-Zellantwort gegen weitere Antigene richtet, die im Rahmen meiner Dissertation nicht berücksichtigt werden konnten. Durch meine Auswahl einer überschaubaren Anzahl von möglichen Epitopkandidaten aus den HHV-6B-Proteinen U11, U54 und U89/90 könnten darüber hinaus weitere, vielleicht immundominantere HHV-6-Epitope vernachlässigt worden sein. Sollte dies der Fall sein, wäre eine höhere Häufigkeit von HHV-6-spezifischen T-Zellen im T-Zellrepertoire von gesunden Virusträgern denkbar. Die recht niedrigen Häufigkeiten der T-Zellen, die spezifisch die von mir selektierten Peptide erkennen, würden dann folglich nicht so immundominante Epitopspezifitäten repräsentieren.

Die Tatsache, dass seit den ersten Untersuchungen zur HHV-6-spezifischen T-Zellantwort durch die japanische Forschergruppe um Yoshihiro Yakushijin und Masaki Yasukawa Anfang der 90er Jahre (Yakushijin et al., 1991, Yakushijin et al., 1992; Yasukawa et al., 1993) **keine neuen Erkenntnisse zur HHV-6-spezifischen T-Zellimmunität veröffentlicht** wurden, deutet jedoch darauf hin, dass HHV-6-spezifische T-Zellen im T-Zellgedächtnis gesunder Virusträger vielleicht wirklich sehr selten und dadurch schwer zu untersuchen sind. Diese frühen Publikationen zeigten, dass nach Stimulation von primären T-Zellen mit Lysaten, die aus mit verschiedenen HHV-6A- und HHV-6B-Stämmen infizierten Zellen hergestellt worden waren, HHV-6A- und HHV-6B-spezifische CD4⁺ T-Zellen proliferieren. Durch limitierende Verdünnung wurden oligoklonale T-Zelllinien hergestellt, die HLA-restringiert mit HHV-6-Lysaten behandelte Zielzellen erkannten und daraufhin verschiedene Effektorfunktionen zeigten, wie antigenspezifische Proliferation, Zytotoxizität und IFN- γ -Freisetzung. Die T-Zelllinien konnten aufgrund ihrer Spezifität in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Ein Teil erkannte nur Lysate aus HHV-6A oder HHV-6B, ein anderer Teil erkannte beide HHV-6-Subtypen. Es gab auch T-Zelllinien, die nach Stimulation mit HHV-6- und HHV-7-Lysaten bzw. mit HHV-6- und CMV-Lysaten proliferierten, und es gab auch solche, die gegen alle humanen β -Herpesviren, also HHV-6, HHV-7 und CMV, reagierten (Yasukawa et al., 1993). Deshalb folgerte die japanische Arbeitsgruppe, dass es CD4-T-Zellepitope gibt, die den verschiedenen β -Herpesviren gemeinsam sind. Nachdem allerdings oligoklonale T-Zelllinien untersucht wurden, halte ich die gleichzeitige Stimulation von herpesvirusspezifischen T-Zellen, die jeweils unterschiedliche Spezifitäten haben, in derselben Subkultur für wahrscheinlicher, weil die Sequenzhomologie zwischen HHV-6 und HHV-7 einerseits und CMV andererseits zu gering ist. Außerdem sind CMV-spezifische Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut von CMV-Virusträgern recht häufig, so dass leicht eine Koexpansion dieser T-Zellen in einer *in vitro*-Kultur erfolgt. Aussagen über die Häufigkeiten solcher HHV-6-positiver CD4⁺ T-Zellen und über ihre Epitopspezifität wurden in diesen Studien nicht gemacht. Erst im Juni 2009 wurden Ergebnisse einer kalifornischen Arbeitsgruppe um Sudhir Gupta veröffentlicht, die zeigen, dass nach Stimulation von primären T-Zellen mit HHV-6A-Lysat nur Gedächtnis-T-Zellen des *effector memory*-Phänotyps (T_{EM}) proliferieren (Gupta et al., 2009). Untersuchungen zur Häufigkeit und Antigenspezifität dieser HHV-6A-spezifischen T-Zellen wurden allerdings auch von dieser Arbeitsgruppe nicht beschrieben.

Meine Ergebnisse und die genannten Indizien machen plausibel, dass HHV-6A- und HHV-6B-spezifische T-Zellen im peripheren Blut von gesunden Virusträgern relativ selten sind. Dies könnte vielleicht daran liegen, dass HHV-6 im Gegensatz zu den anderen Herpesviren vor allem CD4⁺ T-Zellen infiziert. Dieser Zelltyp spielt auch bei der Ausbildung der CD8⁺ T-Zellantwort eine entscheidende Rolle. CD4⁺ T-Helferzellen aktivieren antigenpräsentierende Zellen, wie Makrophagen und B-Zellen, und stimulieren die Differenzierung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. Durch die HHV-6-Infektion könnten diese Zellen an ihrer Funktion gehindert werden, indem beispielsweise der TCR/CD3-Komplex von der Zelloberfläche entfernt wird, ohne dabei zu einer Zellaktivierung zu führen (Sullivan und Coscoy, 2008). Das U21-Genprodukt von HHV-6A und HHV-6B bewirkt außerdem eine Herabregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen, was die Präsentation der in den infizierten Zellen enthaltenen HHV-6-Antigene behindert (Glosson und Hudson, 2007). Durch seine **immunmodulatorischen Eigenschaften** schafft es das Virus vielleicht wirklich erfolgreich, eine starke CD8⁺ T-Zellantwort zu verhindern.

Es ist auch denkbar, dass die Häufigkeit von HHV-6-spezifischen Zellen in anderen Geweben, wie beispielsweise in den Lymphorganen, höher ist. Dort könnten sich nämlich vielleicht auch die latent und vereinzelt lytisch mit HHV-6 infizierten T-Zellen befinden. Die virusspezifischen T-Zellen wären also gerade in den Lymphorganen zur Kontrolle des Virus notwendig. Außerdem könnten während der Latenz des Virus einige der HHV-6-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen (vor allem T_{CM}-Zellen) in den Lymphknoten wandern und verweilen, bis sie gebraucht werden, etwa wenn eine lytische Reaktivierung des HHV-6-Virus stattfindet. Erst dann bewegen sie sich an den Ort der lytischen Infektion und wären vielleicht nur in dieser Phase im peripheren Blut nachweisbar. In der Zukunft könnte deshalb die Häufigkeit HHV-6-spezifischer T-Zellen im lymphoiden Gewebe, wie etwa in Tonsillen oder Adenoiden von HHV-6-positiven Kindern, untersucht werden. Interessant wäre auch die Analyse der HHV-6-spezifischen T-Zellantwort bei Personen, die HHV-6-assoziierte Symptome und erhöhte Virustiter aufweisen. Diese Untersuchungen könnten vielleicht zu einem besseren Verständnis der Mechanismen der HHV-6-spezifischen Immunantwort führen.

Aufgrund meiner Beobachtungen ist anzunehmen, dass HHV-6-spezifische T-Zellen für den therapeutischen Einsatz zur Behandlung von HHV-6-assoziierten Komplikationen beispielsweise nach einer allo-HSCT durch direkte Isolation aus dem Transplantatspender nur schwer herstellbar sind. Es sind nach den bisherigen Erkenntnissen aufwendige Stimulationsprotokolle notwendig, um die virusspezifischen T-Zellen *in vitro* anzureichern, und die Anreicherung ist vielleicht auch nicht bei jedem HHV-6-positiven Spender möglich. Auch die in der Klinik zur Herstellung von CMV- oder EBV-spezifischen T-Zellen bereits angewendeten Verfahren, welche auf der Isolation von Peptid/HLA-multimerbindenden Zellen oder von IFN- γ -sezernierenden Zellen beruhen, dürften höchstwahrscheinlich für die Isolation von HHV-6-spezifischen T-Zellen ungeeignet sein, da diese Zellen auch dazu im peripheren Blut zu selten sind. Um dennoch schnell und effizient HHV-6-spezifische T-Zellen zu generieren, könnte der HHV-6-spezifische TCR der charakterisierten HHV-6-spezifischen T-Zellen auf die T-Zellen des Transplantatspenders übertragen werden.

Dadurch wäre es möglich, wie ich für den Transfer von CMV-TCRs gezeigt habe, mit einer Auswahl von TCRs verschiedener HLA-Restriktionen für viele Spender/Empfänger-Konstellationen HHV-6-TCR-transgene T-Zellen herzustellen, die zur adoptiven T-Zelltherapie von HHV-6-Erkrankungen verwendet werden können. In weiterführenden Arbeiten wird es deshalb notwendig sein, die Charakterisierung der HHV-6-spezifischen T-Zellantwort zu intensivieren. Es wäre dabei durchaus wünschenswert, die Analyse der T-Zellspezifität von den 30 HHV-6B-Peptiden, die durch Prädiktionsalgorithmen für die Bindung an wenige vorausgewählte HLA-Klasse-I-Moleküle ausgewählt wurden, auf weitere Peptide aus den gesamten HHV-6-Antigenen U11, U54 und U89/90 ohne Voreinschränkungen der HLA-Restriktion auszuweiten. Durch Stimulation von primären T-Zellen, die aus dem Blut von verschiedenen HHV-6-positiven Spendern mit unterschiedlichen HLA-Typen isoliert werden könnten, durch den Einsatz einer überlappenden Peptidbank für die HHV-6-Antigene U11, U54 und U89/90 könnten beispielsweise weitere CD8- und zusätzlich auch CD4-T-Zellepitope beschrieben werden, die andere HLA-Restriktionen als HLA-A*0201 haben. Darüber hinaus wäre die Etablierung eines Stimulationssystems, das auf der endogenen Expression der HHV-6-Antigene basiert, ähnlich zu den in dieser Arbeit verwendeten CMV-antigenexprimierenden B-Zellen (mLCLs) denkbar. Dazu könnten ausgewählte HHV-6-Gene, wie etwa U11 oder U54, in einen kleinen EBV-Vektor (nano-EBV, mini-EBV) eingebracht werden. Mit Hilfe der durch die rekombinanten EBV-Viren infizierten, HHV-6-antigenpräsentierenden B-Zellen könnten dann T-Zellen stimuliert werden. Solche B-Zellen, die intrazellulär synthetisiertes HHV-6-Antigen auf HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Molekülen präsentieren, wären darüber hinaus auch als Analysewerkzeug für die Testung der HHV-6-spezifischen Reaktivität von durch Peptidstimulation hergestellten T-Zellen äußerst nützlich.

Insgesamt konnte ich zeigen, dass im T-Zellrepertoire von gesunden HHV-6-Virusträgern HHV-6-spezifische CD8⁺ T-Zellen enthalten sind. Aufgrund konservierter Bindungsmotive ausgewählte und synthetisch hergestellte HHV-6B-Peptide konnten verwendet werden, um HHV-6-spezifische T-Zellen zu stimulieren und *in vitro* anzureichern. Ich konnte CD8⁺ T-Zellklone spezifisch für die U11-Peptide GIL, MLW und SLM sowie für die U54-Peptide ILY und LLC herstellen. Bisher konnten die U54-Peptide ILY und LLC als bei der intrazellulären Prozessierung entstehende und HLA-A*0201-restringierte Epitope bestätigt werden. Damit habe ich die ersten CD8-T-Zellepitope von HHV-6 charakterisiert. Durch ILY/HLA-A*0201-Pentamerfärbung von peripheren Blutzellen konnte ich außerdem zeigen, dass diese HHV-6-spezifischen T-Zellen im T-Zellgedächtnis gesunder Virusträger im Vergleich zu anderen herpesvirusspezifischen T-Zellen selten sind. Diese Erkenntnisse liefern eine Grundlage für weitere Untersuchungen des HHV-6-spezifischen T-Zellrepertoires und helfen, Strategien für die Herstellung von HHV-6-spezifischen T-Zellen für die adoptive Immuntherapie zu entwickeln.

7 Literaturverzeichnis

- Ablashi, D.V., Balachandran, N., Josephs, S.F., Hung, C.L., Krueger, G.R., Kramarsky, B., Salahuddin, S.Z. und Gallo, R.C. (1991). Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* 184, 545-552.
- Akashi, K., Eizuru, Y., Sumiyoshi, Y., Minematsu, T., Hara, S., Harada, M., Kikuchi, M., Niho, Y. und Minamishima, Y. (1993). Brief report: severe infectious mononucleosis-like syndrome and primary human herpesvirus 6 infection in an adult. *N Engl J Med* 329, 168-171.
- Akbar, A.N. und Fletcher, J.M. (2005). Memory T cell homeostasis and senescence during aging. *Curr Opin Immunol* 17, 480-485.
- Alam, S.M., Davies, G.M., Lin, C.M., Zal, T., Nasholds, W., Jameson, S.C., Hogquist, K.A., Gascoigne, N.R. und Travers, P.J. (1999). Qualitative and quantitative differences in T cell receptor binding of agonist and antagonist ligands. *Immunity* 10, 227-237.
- Appay, V., Zaunders, J.J., Papagno, L., Sutton, J., Jaramillo, A., Waters, A., Easterbrook, P., Grey, P., Smith, D., McMichael, A.J., Cooper, D.A., Rowland-Jones, S.L. und Kelleher, A.D. (2002). Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol* 168, 5954-5958.
- Arden, B., Clark, S.P., Kabelitz, D. und Mak, T.W. (1995). Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42, 455-500.
- Arrode, G., Boccaccio, C., Lule, J., Allart, S., Moinard, N., Abastado, J.P., Alam, A. und Davrinche, C. (2000). Incoming human cytomegalovirus pp65 (UL83) contained in apoptotic infected fibroblasts is cross-presented to CD8(+) T cells by dendritic cells. *J Virol* 74, 10018-10024.
- Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J. und Kourilsky, P. (1999). A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 286, 958-961.
- Basta, S. und Bennink, J.R. (2003). A survival game of hide and seek: cytomegaloviruses and MHC class I antigen presentation pathways. *Viral Immunol* 16, 231-242.
- Beck, S. und Barrell, B.G. (1988). Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* 331, 269-272.
- Bevan, M.J. (2004). Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* 4, 595-602.
- Biberfeld, P., Kramarsky, B., Salahuddin, S.Z. und Gallo, R.C. (1987). Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvirus 6) isolated from patients with lymphoproliferative disease. *J Natl Cancer Inst* 79, 933-941.
- Bjorkman, P.J. (1997). MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* 89, 167-170.
- Boeckh, M., Leisenring, W., Riddell, S.R., Bowden, R.A., Huang, M.L., Myerson, D., Stevens-Ayers, T., Flowers, M.E., Cunningham, T. und Corey, L. (2003). Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 101, 407-414.
- Boeckh, M. und Nichols, W.G. (2004). The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood* 103, 2003-2008.
- Borysiewicz, L.K., Graham, S., Hickling, J.K., Mason, P.D. und Sissons, J.G. (1988). Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells: their precursor frequency and stage specificity. *Eur J Immunol* 18, 269-275.
- Boyman, O., Purton, J.F., Surh, C.D. und Sprent, J. (2007). Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr Opin Immunol* 19, 320-326.
- Brennan, R.M., Miles, J.J., Silins, S.L., Bell, M.J., Burrows, J.M. und Burrows, S.R. (2007). Predictable alphabeta T-cell receptor selection toward an HLA-B*3501-restricted human cytomegalovirus epitope. *J Virol* 81, 7269-7273.
- Broers, A.E., van Der Holt, R., van Esser, J.W., Gratama, J.W., Henzen-Logmans, S., Kuenen-Boumeester, V., Lowenberg, B. und Cornelissen, J.J. (2000). Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 95, 2240-2245.

- Bunde, T., Kirchner, A., Hoffmeister, B., Habedank, D., Hetzer, R., Cherepnev, G., Proesch, S., Reinke, P., Volk, H.D., Lehmkuhl, H. und Kern, F. (2005). Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 201, 1031-1036.
- Burrows, S.R., Khanna, R., Burrows, J.M. und Moss, D.J. (1994). An alloresponse in humans is dominated by cytotoxic T lymphocytes (CTL) cross-reactive with a single Epstein-Barr virus CTL epitope: implications for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 179, 1155-1161.
- Carrigan, D.R. und Knox, K.K. (1994). Human herpesvirus 6 (HHV-6) isolation from bone marrow: HHV-6-associated bone marrow suppression in bone marrow transplant patients. *Blood* 84, 3307-3310.
- Caselli, E. und Di Luca, D. (2007). Molecular biology and clinical associations of Roseoloviruses human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. *New Microbiol* 30, 173-187.
- Caserta, M.T., Mock, D.J. und Dewhurst, S. (2001). Human herpesvirus 6. *Clin Infect Dis* 33, 829-833.
- Cawthon, A.G. und Alexander-Miller, M.A. (2002). Optimal colocalization of TCR and CD8 as a novel mechanism for the control of functional avidity. *J Immunol* 169, 3492-3498.
- Cermelli, C., Berti, R., Soldan, S.S., Mayne, M., D'Ambrosia J, M., Ludwin, S.K. und Jacobson, S. (2003). High frequency of human herpesvirus 6 DNA in multiple sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *J Infect Dis* 187, 1377-1387.
- Challoner, P.B., Smith, K.T., Parker, J.D., MacLeod, D.L., Coulter, S.N., Rose, T.M., Schultz, E.R., Bennett, J.L., Garber, R.L., Chang, M. und et al. (1995). Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7440-7444.
- Clay, T.M., Custer, M.C., Sachs, J., Hwu, P., Rosenberg, S.A. und Nishimura, M.I. (1999). Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J Immunol* 163, 507-513.
- Cobbold, M., Khan, N., Pourgheysari, B., Tauro, S., McDonald, D., Osman, H., Assenmacher, M., Billingham, L., Steward, C., Crawley, C., Olavarria, E., Goldman, J., Chakraverty, R., Mahendra, P., Craddock, C. und Moss, P.A. (2005). Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* 202, 379-386.
- Cone, R.W., Hackman, R.C., Huang, M.L., Bowden, R.A., Meyers, J.D., Metcalf, M., Zeh, J., Ashley, R. und Corey, L. (1993). Human herpesvirus 6 in lung tissue from patients with pneumonitis after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 329, 156-161.
- Crumpacker, C.S. (1996). Ganciclovir. *N Engl J Med* 335, 721-729.
- Dahl, H., Fjaertoft, G., Norsted, T., Wang, F.Z., Mousavi-Jazi, M. und Linde, A. (1999). Reactivation of human herpesvirus 6 during pregnancy. *J Infect Dis* 180, 2035-2038.
- Davis, M.M., Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B. und Chien, Y. (1998). Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 523-544.
- Day, E.K., Carmichael, A.J., ten Berge, I.J., Waller, E.C., Sissons, J.G. und Wills, M.R. (2007). Rapid CD8+ T cell repertoire focusing and selection of high-affinity clones into memory following primary infection with a persistent human virus: human cytomegalovirus. *J Immunol* 179, 3203-3213.
- De Bolle, L., Naesens, L. und De Clercq, E. (2005). Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features and therapy. *Clin Microbiol Rev* 18, 217-245.
- Delecluse, H.J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C. und Hammerschmidt, W. (1999). A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5188-5193.
- Dembic, Z., Haas, W., Weiss, S., McCubrey, J., Kiefer, H., von Boehmer, H. und Steinmetz, M. (1986). Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature* 320, 232-238.
- Diamond, D.J., York, J., Sun, J.Y., Wright, C.L. und Forman, S.J. (1997). Development of a candidate HLA A*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection. *Blood* 90, 1751-1767.
- Drobyski, W.R., Knox, K.K., Majewski, D. und Carrigan, D.R. (1994). Brief report: fatal encephalitis due to variant B human herpesvirus-6 infection in a bone marrow-transplant recipient. *N Engl J Med* 330, 1356-1360.

- Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Löffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H.G., Kanz, L., Kleihauer, A., Frank, F., Jahn, G. und Hebart, H. (2002). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99, 3916-3922.
- Elkington, R. und Khanna, R. (2005). Cross-recognition of human alloantigen by cytomegalovirus glycoprotein-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes: implications for graft-versus-host disease. *Blood* 105, 1362-1364.
- Elkington, R., Walker, S., Crough, T., Menzies, M., Tellam, J., Bharadwaj, M. und Khanna, R. (2003). Ex vivo profiling of CD8+-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol* 77, 5226-5240.
- Fahmy, T.M., Bieler, J.G., Edidin, M. und Schneck, J.P. (2001). Increased TCR avidity after T cell activation: a mechanism for sensing low-density antigen. *Immunity* 14, 135-143.
- Faulkner, G.C., Krajewski, A.S. und Crawford, D.H. (2000). The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol* 8, 185-189.
- Fingerroth, J.D., Weis, J.J., Tedder, T.F., Strominger, J.L., Biro, P.A. und Fearon, D.T. (1984). Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4510-4514.
- Fowler, K.B., Stagno, S., Pass, R.F., Britt, W.J., Boll, T.J. und Alford, C.A. (1992). The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 326, 663-667.
- French, C., Menegazzi, P., Nicholson, L., Macaulay, H., DiLuca, D. und Gompels, U.A. (1999). Novel, nonconsensus cellular splicing regulates expression of a gene encoding a chemokine-like protein that shows high variation and is specific for human herpesvirus 6. *Virology* 262, 139-151.
- Gandhi, M.K., Wills, M.R., Okecha, G., Day, E.K., Hicks, R., Marcus, R.E., Sissons, J.G. und Carmichael, A.J. (2003). Late diversification in the clonal composition of human cytomegalovirus-specific CD8+ T cells following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood* 102, 3427-3438.
- Ganepola, S., Gentilini, C., Hilbers, U., Lange, T., Rieger, K., Hofmann, J., Maier, M., Liebert, U.G., Niederwieser, D., Engelmann, E., Heilbronn, R., Thiel, E. und Uharek, L. (2007). Patients at high risk for CMV infection and disease show delayed CD8+ T-cell immune recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 39, 293-299.
- Gao, G.F., Rao, Z. und Bell, J.I. (2002). Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands. *Trends Immunol* 23, 408-413.
- Garboczi, D.N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q.R., Biddison, W.E. und Wiley, D.C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384, 134-141.
- Garcia, K.C., Scott, C.A., Brunmark, A., Carbone, F.R., Peterson, P.A., Wilson, I.A. und Teyton, L. (1996). CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* 384, 577-581.
- Garrone, P., Neidhardt, E.M., Garcia, E., Galibert, L., van Kooten, C. und Banchereau, J. (1995). Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 182, 1265-1273.
- Gascoigne, N.R., Alam, S.M., Lin, C.M., McGuire, M.V., Marine, S., Niederberger, N., Redpath, S., Sim, B.C., Travers, P.J., Yachi, P., Zal, M.A. und Zal, T. (2000). T cell receptor binding kinetics and special role of Valpha in T cell development and activation. *Immunol Res* 21, 225-231.
- Gillespie, G.M., Wills, M.R., Appay, V., O'Callaghan, C., Murphy, M., Smith, N., Sissons, P., Rowland-Jones, S., Bell, J.I. und Moss, P.A. (2000). Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol* 74, 8140-8150.
- Glosson, N.L. und Hudson, A.W. (2007). Human herpesvirus-6A and -6B encode viral immunoevasins that downregulate class I MHC molecules. *Virology* 365, 125-135.
- Gompels, U.A., Nicholas, J., Lawrence, G., Jones, M., Thomson, B.J., Martin, M.E., Efstathiou, S., Craxton, M. und Macaulay, H.A. (1995). The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* 209, 29-51.
- Goodman, A.D., Mock, D.J., Powers, J.M., Baker, J.V. und Blumberg, B.M. (2003). Human herpesvirus 6 genome and antigen in acute multiple sclerosis lesions. *J Infect Dis* 187, 1365-1376.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. und Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.

- Greenberg, P.D. und Riddell, S.R. (1999). Deficient cellular immunity--finding and fixing the defects. *Science* 285, 546-551.
- Grivel, J.C., Ito, Y., Faga, G., Santoro, F., Shaheen, F., Malnati, M.S., Fitzgerald, W., Lusso, P. und Margolis, L. (2001). Suppression of CCR5- but not CXCR4-tropic HIV-1 in lymphoid tissue by human herpesvirus 6. *Nat Med* 7, 1232-1235.
- Grivel, J.C., Santoro, F., Chen, S., Faga, G., Malnati, M.S., Ito, Y., Margolis, L. und Lusso, P. (2003). Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *J Virol* 77, 8280-8289.
- Gupta, S., Agrawal, S. und Gollapudi, S. (2009). Differential effect of human herpesvirus 6A on cell division and apoptosis among naive and central and effector memory CD4+ and CD8+ T-cell subsets. *J Virol* 83, 5442-5450.
- Hahn, G., Jores, R. und Mocarski, E.S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3937-3942.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Haque, T., Wilkie, G.M., Jones, M.M., Higgins, C.D., Urquhart, G., Wingate, P., Burns, D., McAulay, K., Turner, M., Bellamy, C., Amlot, P.L., Kelly, D., MacGilchrist, A., Gandhi, M.K., Swerdlow, A.J. und Crawford, D.H. (2007). Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 110, 1123-1131.
- Hebart, H., Deginik, S., Stevanovic, S., Grigoleit, U., Dobler, A., Baur, M., Rauser, G., Sinzger, C., Jahn, G., Loeffler, J., Kanz, L., Rammensee, H.G. und Einsele, H. (2002). Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 99, 3830-3837.
- Heemskerk, M.H., Hagedoorn, R.S., van der Hoorn, M.A., van der Veken, L.T., Hoogeboom, M., Kester, M.G., Willemze, R. und Falkenburg, J.H. (2007). Efficiency of T-cell receptor expression in dual-specific T cells is controlled by the intrinsic qualities of the TCR chains within the TCR-CD3 complex. *Blood* 109, 235-243.
- Heemskerk, M.H., Hoogeboom, M., de Paus, R.A., Kester, M.G., van der Hoorn, M.A., Goulmy, E., Willemze, R. und Falkenburg, J.H. (2003). Redirection of antileukemic reactivity of peripheral T lymphocytes using gene transfer of minor histocompatibility antigen HA-2-specific T-cell receptor complexes expressing a conserved alpha joining region. *Blood* 102, 3530-3540.
- Heemskerk, M.H., Hoogeboom, M., Hagedoorn, R., Kester, M.G., Willemze, R. und Falkenburg, J.H. (2004). Reprogramming of virus-specific T cells into leukemia-reactive T cells using T cell receptor gene transfer. *J Exp Med* 199, 885-894.
- Hentrich, M., Oruzio, D., Jager, G., Schlemmer, M., Schleuning, M., Schiel, X., Hiddemann, W. und Kolb, H.J. (2005). Impact of human herpesvirus-6 after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 128, 66-72.
- Heslop, H.E., Ng, C.Y., Li, C., Smith, C.A., Loftin, S.K., Krance, R.A., Brenner, M.K. und Rooney, C.M. (1996). Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 2, 551-555.
- Heslop, H.E. und Rooney, C.M. (1997). Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative disease. *Immunol Rev* 157, 217-222.
- Humar, A., Kumar, D., Caliendo, A.M., Moussa, G., Ashi-Sulaiman, A., Levy, G. und Mazzulli, T. (2002). Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation* 73, 599-604.
- Imai, S., Nishikawa, J. und Takada, K. (1998). Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J Virol* 72, 4371-4378.
- Isegawa, Y., Ping, Z., Nakano, K., Sugimoto, N. und Yamanishi, K. (1998). Human herpesvirus 6 open reading frame U12 encodes a functional beta-chemokine receptor. *J Virol* 72, 6104-6112.
- Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G. und Schoenberger, S.P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421, 852-856.
- Karrer, U., Sierro, S., Wagner, M., Oxenius, A., Hengel, H., Koszinowski, U.H., Phillips, R.E. und Klennerman, P. (2003). Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time. *J Immunol* 170, 2022-2029.

- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., Sugden, B. und Hammerschmidt, W. (1995). Immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 69, 231-238.
- Kern, F., Bunde, T., Faulhaber, N., Kiecker, F., Khatamzas, E., Rudawski, I.M., Pruss, A., Gratama, J.W., Volkmer-Engert, R., Ewert, R., Reinke, P., Volk, H.D. und Picker, L.J. (2002). Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J Infect Dis* 185, 1709-1716.
- Kern, F., Faulhaber, N., Frommel, C., Khatamzas, E., Prosch, S., Schonemann, C., Kretzschmar, I., Volkmer-Engert, R., Volk, H.D. und Reinke, P. (2000). Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol* 30, 1676-1682.
- Kern, F., Surel, I.P., Faulhaber, N., Frommel, C., Schneider-Mergener, J., Schonemann, C., Reinke, P. und Volk, H.D. (1999). Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *J Virol* 73, 8179-8184.
- Khan, N., Cobbold, M., Keenan, R. und Moss, P.A. (2002). Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype. *J Infect Dis* 185, 1025-1034.
- Kieback, E., Charo, J., Sommermeyer, D., Blankenstein, T. und Uckert, W. (2008). A safeguard eliminates T cell receptor gene-modified autoreactive T cells after adoptive transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 623-628.
- Kleihauer, A., Grigoleit, U., Hebart, H., Moris, A., Brossart, P., Muhm, A., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., Sinzger, C., Riegler, S., Jahn, G., Kanz, L. und Einsele, H. (2001). Ex vivo generation of human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells by peptide-pulsed dendritic cells. *Br J Haematol* 113, 231-239.
- Knox, K.K. und Carrigan, D.R. (1992). In vitro suppression of bone marrow progenitor cell differentiation by human herpesvirus 6 infection. *J Infect Dis* 165, 925-929.
- Kondo, E., Akatsuka, Y., Kuzushima, K., Tsujimura, K., Asakura, S., Tajima, K., Kagami, Y., Kodera, Y., Tanimoto, M., Morishima, Y. und Takahashi, T. (2004). Identification of novel CTL epitopes of CMV-pp65 presented by a variety of HLA alleles. *Blood* 103, 630-638.
- Kondo, K., Kondo, T., Okuno, T., Takahashi, M. und Yamanishi, K. (1991). Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol* 72 (Pt 6), 1401-1408.
- Lefranc, M.P. (2003). IMGT databases, web resources and tools for immunoglobulin and T cell receptor sequence analysis, <http://imgt.cines.fr>. *Leukemia* 17, 260-266.
- Leisegang, M., Engels, B., Meyerhuber, P., Kieback, E., Sommermeyer, D., Xue, S.A., Reuss, S., Stauss, H. und Uckert, W. (2008). Enhanced functionality of T cell receptor-redirected T cells is defined by the transgene cassette. *J Mol Med* 86, 573-583.
- Li, C.R., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Goodrich, J.M. und Riddell, S.R. (1994). Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 83, 1971-1979.
- Li Pira, G., Bottone, L., Ivaldi, F., Pelizzoli, R., Del Galdo, F., Lozzi, L., Bracci, L., Loregian, A., Palu, G., De Palma, R., Einsele, H. und Manca, F. (2004). Identification of new Th peptides from the cytomegalovirus protein pp65 to design a peptide library for generation of CD4 T cell lines for cellular immunoreconstitution. *Int Immunol* 16, 635-642.
- Li, Q., Spriggs, M.K., Kovats, S., Turk, S.M., Comeau, M.R., Nepom, B. und Hutt-Fletcher, L.M. (1997). Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* 71, 4657-4662.
- Liszewski, M.K., Post, T.W. und Atkinson, J.P. (1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 9, 431-455.
- Ljungman, P., Wang, F.Z., Clark, D.A., Emery, V.C., Remberger, M., Ringden, O. und Linde, A. (2000). High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. *Br J Haematol* 111, 774-781.
- Loenen, W.A., Bruggeman, C.A. und Wiertz, E.J. (2001). Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology. *Semin Immunol* 13, 41-49.

- Longmate, J., York, J., La Rosa, C., Krishnan, R., Zhang, M., Senitzer, D. und Diamond, D.J. (2001). Population coverage by HLA class-I restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *Immunogenetics* 52, 165-173.
- Lozzio, C.B. und Lozzio, B.B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334.
- Lusso, P. (2006). HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape. *J Clin Virol* 37 Suppl 1, S4-10.
- Lusso, P., De Maria, A., Malnati, M., Lori, F., DeRocco, S.E., Baseler, M. und Gallo, R.C. (1991). Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature* 349, 533-535.
- Lusso, P., Markham, P.D., Tschachler, E., di Marzo Veronese, F., Salahuddin, S.Z., Ablashi, D.V., Pahwa, S., Krohn, K. und Gallo, R.C. (1988). In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Exp Med* 167, 1659-1670.
- Maecker, H.T., Dunn, H.S., Suni, M.A., Khatamzas, E., Pitcher, C.J., Bunde, T., Persaud, N., Trigona, W., Fu, T.M., Sinclair, E., Bredt, B.M., McCune, J.M., Maino, V.C., Kern, F. und Picker, L.J. (2001). Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J Immunol Methods* 255, 27-40.
- Matsui, K., Boniface, J.J., Steffner, P., Reay, P.A. und Davis, M.M. (1994). Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12862-12866.
- McLaughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S.J., Tanamachi, B., Li, C.R., Zaia, J.A., Greenberg, P.D. und Riddell, S.R. (1994). Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol* 43, 103-110.
- Miller, G. und Lipman, M. (1973). Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 190-194.
- Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D. und Lipman, M. (1972). Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 383-387.
- Milne, R.S., Mattick, C., Nicholson, L., Devaraj, P., Alcamì, A. und Gompels, U.A. (2000). RANTES binding and down-regulation by a novel human herpesvirus-6 beta chemokine receptor. *J Immunol* 164, 2396-2404.
- Minowada, J., Onuma, T. und Moore, G.E. (1972). Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* 49, 891-895.
- Mocarski, E.S., Jr. (2004). Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell Microbiol* 6, 707-717.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. und Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
- Moody, A.M., Xiong, Y., Chang, H.C. und Reinherz, E.L. (2001). The CD8alpha beta co-receptor on double-positive thymocytes binds with differing affinities to the products of distinct class I MHC loci. *Eur J Immunol* 31, 2791-2799.
- Moosmann, A., Khan, N., Cobbold, M., Zentz, C., Delecluse, H.J., Hollweck, G., Hislop, A.D., Blake, N.W., Croom-Carter, D., Wollenberg, B., Moss, P.A., Zeidler, R., Rickinson, A.B. und Hammerschmidt, W. (2002). B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells. *Blood* 100, 1755-1764.
- Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Yang, J.C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Restifo, N.P., Zheng, Z., Nahvi, A., de Vries, C.R., Rogers-Freezer, L.J., Mavroukakis, S.A. und Rosenberg, S.A. (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314, 126-129.
- Moss, P. und Rickinson, A. (2005). Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nat Rev Immunol* 5, 9-20.
- Nickel, P., Bold, G., Presber, F., Biti, D., Babel, N., Kreutzer, S., Pratschke, J., Schonemann, C., Kern, F., Volk, H.D. und Reinke, P. (2009). High levels of CMV-IE-1-specific memory T cells are associated with less alloimmunity and improved renal allograft function. *Transpl Immunol* 20, 238-242.

- Niederman, J.C., Liu, C.R., Kaplan, M.H. und Brown, N.A. (1988). Clinical and serological features of human herpesvirus-6 infection in three adults. *Lancet* 2, 817-819.
- Niiya, H., Azuma, T., Jin, L., Uchida, N., Inoue, A., Hasegawa, H., Fujita, S., Tohyama, M., Hashimoto, K. und Yasukawa, M. (2004). Transcriptional downregulation of DC-SIGN in human herpesvirus 6-infected dendritic cells. *J Gen Virol* 85, 2639-2642.
- Parker, K.C., Bednarek, M.A. und Coligan, J.E. (1994). Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* 152, 163-175.
- Peggs, K.S., Verfurth, S., Pizzey, A., Khan, N., Guiver, M., Moss, P.A. und Mackinnon, S. (2003). Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* 362, 1375-1377.
- Pope, J.H., Horne, M.K. und Scott, W. (1968). Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer* 3, 857-866.
- Pourgheysari, B., Khan, N., Best, D., Bruton, R., Nayak, L. und Moss, P.A. (2007). The cytomegalovirus-specific CD4+ T-cell response expands with age and markedly alters the CD4+ T-cell repertoire. *J Virol* 81, 7759-7765.
- Price, D.A., Brenchley, J.M., Ruff, L.E., Betts, M.R., Hill, B.J., Roederer, M., Koup, R.A., Migueles, S.A., Gostick, E., Wooldridge, L., Sewell, A.K., Connors, M. und Douek, D.C. (2005). Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8+ T cell populations specific for persistent DNA viruses. *J Exp Med* 202, 1349-1361.
- Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A. und Stevanovic, S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- Razonable, R.R., Fanning, C., Brown, R.A., Espy, M.J., Rivero, A., Wilson, J., Kremers, W., Smith, T.F. und Paya, C.V. (2002). Selective reactivation of human herpesvirus 6 variant a occurs in critically ill immunocompetent hosts. *J Infect Dis* 185, 110-113.
- Reddehase, M.J. (2002). Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol* 2, 831-844.
- Reusser, P., Riddell, S.R., Meyers, J.D. und Greenberg, P.D. (1991). Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78, 1373-1380.
- Reyburn, H.T., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Davis, D.M., Pazmany, L. und Strominger, J.L. (1997). The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 386, 514-517.
- Rickinson, A.B. und Kieff, E. (2001). Epstein-Barr Virus. In *Fields Virology*, H. Knipe, ed. (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins), pp. 2575-2627.
- Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, C.R., Agha, M.E. und Greenberg, P.D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257, 238-241.
- Rizzieri, D.A., Dev, P., Long, G.D., Gasparetto, C., Sullivan, K.M., Horwitz, M., Chute, J. und Chao, N.J. (2009). Response and toxicity of donor lymphocyte infusions following T-cell depleted non-myeloablative allogeneic hematopoietic SCT from 3-6/6 HLA matched donors. *Bone Marrow Transplant* 43, 327-333.
- Rooney, C.M., Smith, C.A., Ng, C.Y., Loftin, S.K., Sixbey, J.W., Gan, Y., Srivastava, D.K., Bowman, L.C., Krance, R.A., Brenner, M.K. und Heslop, H.E. (1998). Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92, 1549-1555.
- Roth, M.E., Lacy, M.J., McNeil, L.K. und Kranz, D.M. (1989). Analysis of T cell receptor transcripts using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 7, 746-754.
- Rowe, M., Lear, A.L., Croom-Carter, D., Davies, A.H. und Rickinson, A.B. (1992). Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. *J Virol* 66, 122-131.
- Salahuddin, S.Z., Ablashi, D.V., Markham, P.D., Josephs, S.F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., Halligan, G., Biberfeld, P., Wong-Staal, F., Kramarsky, B. und et al. (1986). Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 234, 596-601.

- Sambrook, J., und Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning a laboratory manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, (N.Y.), Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Santoro, F., Kennedy, P.E., Locatelli, G., Malnati, M.S., Berger, E.A. und Lusso, P. (1999). CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 99, 817-827.
- Sarawar, S.R., Lee, B.J., Reiter, S.K. und Schoenberger, S.P. (2001). Stimulation via CD40 can substitute for CD4 T cell function in preventing reactivation of a latent herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6325-6329.
- Sartori, A., Ma, X., Gri, G., Showe, L., Benjamin, D. und Trinchieri, G. (1997). Interleukin-12: an immunoregulatory cytokine produced by B cells and antigen-presenting cells. *Methods* 11, 116-127.
- Savard, M., Belanger, C., Tardif, M., Gourde, P., Flamand, L. und Gosselin, J. (2000). Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol* 74, 2612-2619.
- Savoldo, B., Cabbage, M.L., Durett, A.G., Goss, J., Huls, M.H., Liu, Z., Teresita, L., Gee, A.P., Ling, P.D., Brenner, M.K., Heslop, H.E. und Rooney, C.M. (2002). Generation of EBV-specific CD4+ cytotoxic T cells from virus naive individuals. *J Immunol* 168, 909-918.
- Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R. und Melief, C.J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.
- Schumacher, T.N. (2002). T-cell-receptor gene therapy. *Nat Rev Immunol* 2, 512-519.
- Schuster, I.G., Busch, D.H., Eppinger, E., Kremmer, E., Milosevic, S., Hennard, C., Kuttler, C., Ellwart, J.W., Frankenberger, B., Nossner, E., Salat, C., Bogner, C., Borkhardt, A., Kolb, H.J. und Krackhardt, A.M. (2007). Allorestricted T cells with specificity for the FMNL1-derived peptide PP2 have potent antitumor activity against hematologic and other malignancies. *Blood* 110, 2931-2939.
- Shedlock, D.J. und Shen, H. (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300, 337-339.
- Singh, N. und Paterson, D.L. (2000). Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in transplant recipients: relevance of a novel neurotropic virus. *Transplantation* 69, 2474-2479.
- Sissons, J.G. und Carmichael, A.J. (2002). Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. *J Infect* 44, 78-83.
- Smith, M.G. (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 92, 424-430.
- Soderberg-Naucler, C., Fish, K.N. und Nelson, J.A. (1997). Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 91, 119-126.
- Stagno, S., Pass, R.F., Cloud, G., Britt, W.J., Henderson, R.E., Walton, P.D., Veren, D.A., Page, F. und Alford, C.A. (1986). Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *Jama* 256, 1904-1908.
- Stauss, H.J., Cesco-Gaspere, M., Thomas, S., Hart, D.P., Xue, S.A., Holler, A., Wright, G., Perro, M., Little, A.M., Pospori, C., King, J. und Morris, E.C. (2007). Monoclonal T-cell receptors: new reagents for cancer therapy. *Mol Ther* 15, 1744-1750.
- Steinle, A., Reinhardt, C., Jantzer, P. und Schendel, D.J. (1995). In vivo expansion of HLA-B35 alloreactive T cells sharing homologous T cell receptors: evidence for maintenance of an oligoclonally dominated allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex. *J Exp Med* 181, 503-513.
- Sullivan, B.M. und Coscoy, L. (2008). Downregulation of the T-cell receptor complex and impairment of T-cell activation by human herpesvirus 6 u24 protein. *J Virol* 82, 602-608.
- Sun, J.C. und Bevan, M.J. (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300, 339-342.
- Sylwester, A.W., Mitchell, B.L., Edgar, J.B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P.R., Grabstein, K.H., Hosken, N.A., Kern, F., Nelson, J.A. und Picker, L.J. (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 202, 673-685.

- Szmania, S., Galloway, A., Bruorton, M., Musk, P., Aubert, G., Arthur, A., Pyle, H., Hensel, N., Ta, N., Lamb, L., Jr., Dodi, T., Madrigal, A., Barrett, J., Henslee-Downey, J. und van Rhee, F. (2001). Isolation and expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes to clinical scale from a single blood draw using dendritic cells and HLA-tetramers. *Blood* 98, 505-512.
- Takahashi, K., Sonoda, S., Higashi, K., Kondo, T., Takahashi, H., Takahashi, M. und Yamanishi, K. (1989). Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol* 63, 3161-3163.
- Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J. und Wilkinson, G.W. (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287, 1031.
- Trautmann, L., Rimbart, M., Echasserieau, K., Saulquin, X., Neveu, B., Dechanet, J., Cerundolo, V. und Bonneville, M. (2005). Selection of T cell clones expressing high-affinity public TCRs within Human cytomegalovirus-specific CD8 T cell responses. *J Immunol* 175, 6123-6132.
- Uckert, W., Becker, C., Gladow, M., Klein, D., Kammertoens, T., Pedersen, L. und Blankenstein, T. (2000). Efficient gene transfer into primary human CD8+ T lymphocytes by MuLV-10A1 retrovirus pseudotype. *Hum Gene Ther* 11, 1005-1014.
- Uckert, W. und Schumacher, T.N. (2009). TCR transgenes and transgene cassettes for TCR gene therapy: status in 2008. *Cancer Immunol Immunother* 58, 809-822.
- van der Veken, L.T., Hagedoorn, R.S., van Loenen, M.M., Willemze, R., Falkenburg, J.H. und Heemskerk, M.H. (2006). Alphabeta T-cell receptor engineered gammadelta T cells mediate effective antileukemic reactivity. *Cancer Res* 66, 3331-3337.
- van Lent, A.U., Nagasawa, M., van Loenen, M.M., Schotte, R., Schumacher, T.N., Heemskerk, M.H., Spits, H. und Legrand, N. (2007). Functional human antigen-specific T cells produced in vitro using retroviral T cell receptor transfer into hematopoietic progenitors. *J Immunol* 179, 4959-4968.
- van Loenen, M.M., Hagedoorn, R.S., Kester, M.G., Hoogeboom, M., Willemze, R., Falkenburg, J.H. und Heemskerk, M.H. (2009). Kinetic preservation of dual specificity of coprogrammed minor histocompatibility antigen-reactive virus-specific T cells. *Cancer Res* 69, 2034-2041.
- Venturi, V., Chin, H.Y., Asher, T.E., Ladell, K., Scheinberg, P., Bornstein, E., van Bockel, D., Kelleher, A.D., Douek, D.C., Price, D.A. und Davenport, M.P. (2008). TCR beta-chain sharing in human CD8+ T cell responses to cytomegalovirus and EBV. *J Immunol* 181, 7853-7862.
- Versteegen, J.M., Logtenberg, T. und Ballieux, R.E. (1988). Enumeration of IFN-gamma-producing human lymphocytes by spot-ELISA. A method to detect lymphokine-producing lymphocytes at the single-cell level. *J Immunol Methods* 111, 25-29.
- Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D. und Riddell, S.R. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 333, 1038-1044.
- Weekes, M.P., Wills, M.R., Mynard, K., Carmichael, A.J. und Sissons, J.G. (1999). The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo. *J Virol* 73, 2099-2108.
- Widmann, T., Sester, U., Gartner, B.C., Schubert, J., Pfreundschuh, M., Kohler, H. und Sester, M. (2008). Levels of CMV specific CD4 T cells are dynamic and correlate with CMV viremia after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS ONE* 3, e3634.
- Wiesner, M. (2005). Die Diversität Cytomegalovirus-spezifischer T-Zellen nach Selektion mittels B-Zell-Vektoren. In Fakultät für Chemie und Pharmazie (München, Ludwig-Maximilians-Universität).
- Wiesner, M., Zentz, C., Hammer, M.H., Cobbold, M., Kern, F., Kolb, H.J., Hammerschmidt, W., Zeidler, R. und Moosmann, A. (2005). Selection of CMV-specific CD8+ and CD4+ T cells by mini-EBV-transformed B cell lines. *Eur J Immunol* 35, 2110-2121.
- Wiesner, M., Zentz, C., Mayr, C., Wimmer, R., Hammerschmidt, W., Zeidler, R. und Moosmann, A. (2008). Conditional immortalization of human B cells by CD40 ligation. *PLoS ONE* 3, e1464.
- Wills, M.R., Carmichael, A.J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M.P., Plachter, B. und Sissons, J.G. (1996). The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity und T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 70, 7569-7579.

- Wyer, J.R., Willcox, B.E., Gao, G.F., Gerth, U.C., Davis, S.J., Bell, J.I., van der Merwe, P.A. und Jakobsen, B.K. (1999). T cell receptor and coreceptor CD8 alphaalpha bind peptide-MHC independently and with distinct kinetics. *Immunity* 10, 219-225.
- Xiong, Y., Kern, P., Chang, H. und Reinherz, E. (2001). T Cell Receptor Binding to a pMHCII Ligand Is Kinetically Distinct from and Independent of CD4. *J Biol Chem* 276, 5659-5667.
- Yakushijin, Y., Yasukawa, M. und Kobayashi, Y. (1991). T-cell immune response to human herpesvirus-6 in healthy adults. *Microbiol Immunol* 35, 655-660.
- Yakushijin, Y., Yasukawa, M. und Kobayashi, Y. (1992). Establishment and functional characterization of human herpesvirus 6-specific CD4+ human T-cell clones. *J Virol* 66, 2773-2779.
- Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y. und Kurata, T. (1988). Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1, 1065-1067.
- Yasukawa, M., Yakushijin, Y., Furukawa, M. und Fujita, S. (1993). Specificity analysis of human CD4+ T-cell clones directed against human herpesvirus 6 (HHV-6), HHV-7, and human cytomegalovirus. *J Virol* 67, 6259-6264.
- Yoshikawa, T., Ihira, M., Suzuki, K., Suga, S., Iida, K., Saito, Y., Asonuma, K., Tanaka, K. und Asano, Y. (2000). Human herpesvirus 6 infection after living related liver transplantation. *J Med Virol* 62, 52-59.
- Yoshikawa, T., Suga, S., Asano, Y., Nakashima, T., Yazaki, T., Ono, Y., Fujita, T., Tsuzuki, K., Sugiyama, S. und Oshima, S. (1992). A prospective study of human herpesvirus-6 infection in renal transplantation. *Transplantation* 54, 879-883.
- Zentz, C., Wiesner, M., Man, S., Frankenberger, B., Wollenberg, B., Hillemanns, P., Zeidler, R., Hammerschmidt, W. und Moosmann, A. (2007). Activated B cells mediate efficient expansion of rare antigen-specific T cells. *Hum Immunol* 68, 75-85.
- Zerr, D.M. (2006). Human herpesvirus 6: a clinical update. *Herpes* 13, 20-24.
- Zerr, D.M., Corey, L., Kim, H.W., Huang, M.L., Nguy, L. und Boeckh, M. (2005). Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 40, 932-940.
- Zhou, D., Srivastava, R., Grummel, V., Cepok, S., Hartung, H.P. und Hemmer, B. (2006). High throughput analysis of TCR-beta rearrangement and gene expression in single T cells. *Lab Invest* 86, 314-321.
- Zou, P., Isegawa, Y., Nakano, K., Haque, M., Horiguchi, Y. und Yamanishi, K. (1999). Human herpesvirus 6 open reading frame U83 encodes a functional chemokine. *J Virol* 73, 5926-5933.

8 Abkürzungen

AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
allo-HSCT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
allo-KMT	allogene Knochenmarkstransplantation
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
BBL	B-Blasten (CD40-aktivierte B-Zellen)
BCIP/NPT	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitrotetrazolblauchlorid
bp	Basenpaare
CD...	<i>cluster of differentiation</i> (Oberflächenmarker)
CDR	komplementaritätsbestimmende Region (<i>complementarity-determining region</i>)
CMV	Cytomegalievirus
CsA	Cyclosporin A
D	Spender (<i>donor</i>)
DC	dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FLAG	Flag-Epitop (Aminosäuresequenz: DYKDDDDK)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
HBLV	humanes B-lymphotropes Virus (alte Bezeichnung von HHV-6)
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HHV-6	humanes Herpesvirus 6
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus 1 (Lippenherpesvirus)
HTLV-1	humanes T-lymphotropes Virus 1
IE	<i>immediate early</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
J76	Jurkat76

J76CD8	Jurkat76&CD8
KSV	Kaposi-Sarkom-Virus
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (EBV-transformierte B-Zelllinie)
LTR	<i>long terminal repeats</i>
MACS	magnetic cell sorting
mHA	<i>minor histocompatibility antigen</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mLCL	mini-lymphoblastoide Zelllinie (mini-EBV-transformierte B-Zelllinie)
Mo-MLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MPSV	myeloproliferatives Sarkomvirus
mSS	<i>modified mRNA splice-site</i>
MuLV	murines Leukämievirus
n.u.	nicht untersucht
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
OKT-3	anti-CD3-Antikörper
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
pCMV	CMV-Promotor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin5
PHA	Phytohämagglutinin M
<i>p</i> -NPP	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat
PRE	posttranskriptionelles Element
PTLD	<i>post-transplant lymphoproliferative disease</i>
R	Empfänger (<i>recipient</i>)
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
T _{CM}	T-Zellen mit <i>central memory</i> -Phänotyp
TCR	T-Zellrezeptor
T _{EM}	T-Zellen mit <i>effector memory</i> -Phänotyp
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPA	Tetradecanoylphorbolacetat
U	<i>unit</i>
VZV	Varicella-Zoster-Virus (Windpockenvirus)
z.B.	zum Beispiel

Herzlichen Dank

...an alle, die mich und meine Arbeit unterstützt haben.

...an **Dr. Andreas Moosmann**, für dieses Projekt, das ich in alle Richtungen frei gestalten konnte, für seine immer hilfreichen Tipps und Ideen, für seine Geduld und für die exzellente Betreuung, dafür, dass ich in eigener Verantwortung Praktikanten betreuen durfte, sowie für sein immer offenes Ohr bei Problemen aller Art und nicht zuletzt für die vielen interessanten Diskussionen und kurzweiligen Stunden im Labor und in der Kaffeeküche.

... an **Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt** für die Übernahme der offiziellen Betreuung, für sein Interesse an meiner Arbeit, anregende Diskussionen sowie für seinen unterstützenden Rat, wo immer es nötig war. Danke auch für das freundliche und hilfsbereite Klima in der Abteilung Genvektoren.

...an **Prof. Dr. Horst Domdey** dafür, dass er sich als Gutachter dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat und jederzeit als Ansprechpartner für mich da war.

...an meine Praktikanten **Benjamin, Martin, Larissa und Stefan** für die tatkräftige Unterstützung meiner Dissertationsprojekte, die für mich äußerst hilfreich und motivierend war, dafür, dass sie sich als "Versuchskanninchen" zur Verfügung gestellt haben, damit ich mich als "Betreuerin" ausprobieren konnte, für das Vertrauen, das sie mir entgegenbrachten, so dass die Zusammenarbeit echt Spass machen konnte, sowie für ihre nette und aufgeschlossene Art, die mir so viele fröhliche und abwechslungsreiche Stunden im Labor wie auch in der Freizeit beschert hat.

... an **Dr. Ingrid Schuster**, die mich unermüdlich und überaus hilfsbereit in die Protokolle des retroviralen TCR-Transfers eingeweiht hat und mir geholfen hat, diese erfolgreich für meine Bedürfnisse anzuwenden. Danke auch für das offene Ohr und die vielen angenehmen und interessanten Abende und Kaffeepausen!

...an **Prof. Wolfgang Uckert** und seine Gruppe am Max-Delbrück-Zentrum in Berlin, dafür, dass sie mir die Methode des retroviralen TCR-Transfers und alle dafür nötigen Vektoren und Zelllinien zur Verfügung gestellt haben.

...an alle **freiwilligen Blutspender**, ohne die meine Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

...an **Simon** für seine Tipps und Tricks im Laboralltag und die seelische Unterstützung, die mir in so manchen Situationen geholfen hat, Probleme und Problemchen mit Humor und Fassung zu ertragen.

...an **Marc** für seine Fröhlichkeit und Unternehmungslust, mit der er mich beim Mittagessen, Kaffee oder Bier oft auf andere Gedanken gebracht hat, sowie für seine aufgeschlossene Art und fast durchgehend gute Laune, die es mir und auch meinen Praktikanten einfach gemacht hat, im Labor Spass zu haben und sich wohl zu fühlen.

...an die verbleibenden Laborkolleginnen und Laborkollegen **Steffi A., Christina, Steffi I. und Reinhard** für die nette und angenehme Arbeitsatmosphäre.

...an alle **Kolleginnen und Kollegen in der Abteilung Genvektoren** für ihre Aufgeschlossenheit und Hilfsbereitschaft, die mir immer das Gefühl gab, dazuzugehören.

...an **Elke und Kai** für die stimulierenden Diskussionen und angenehmen Gespräche – nicht nur beim Mittagessen!

...an meinen Freund **Conny** für sein immer offenes Ohr für meine Sorgen und Probleme, für das geduldige Zuhören, wenn ich einfach nur meinen Frust loswerden will, für die hilfreichen Ratschläge und die oft notwendige Bestärkung und auch dafür, dass er mir in stressigen Zeiten immer den Rücken frei gehalten hat. Ein ganz besonderes danke auch für die vielen erholsamen und glücklichen Stunden, die mir immer wieder neue Kraft verleihen und mich zu einem zufriedenen und ausgeglichenen Menschen machen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Andrea Schub

geboren am 04.03.1980 in Bogen

deutsch, ledig, keine Kinder

Ausbildung

09/1986 – 07/1991

Volksschule Haibach

09/1991 – 06/2000

Veit-Höser-Gymnasium Bogen (Abschluss: Abitur)

10/2000 – 04/2006

Chemiestudium an der Universität Regensburg (Abschluss: Diplom)

Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums in Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. Susanne Modrow mit dem Thema "Die Immunantwort gegen das humane Parvovirus B19: Einsatz gentechnischer Vektorsysteme zur Bestimmung virusspezifischer CD4- und CD8-positiver T-Zellen"

01/2006 – 02/2006

Forschungsaufenthalt am Department of Virology des Haartman Instituts in Helsinki im Rahmen der Diplomarbeit finanziert durch das „DAAD-Personenaustauschprogramm mit Finnland“

09/2006 – 12/2009

Doktorarbeit am Helmholtz Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt in der Abteilung Genvektoren unter Anleitung von Dr. Andreas Moosmann und Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt

Externe Promotion der Ludwig-Maximilians-Universität München, Fakultät für Chemie und Pharmazie

Erstbegutachtung: Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt

Fachvertreter: Prof. Dr. Horst Domdey

Praktika

07/2003 – 08/2003

Profos AG, Regensburg mit dem Thema "Entwicklung und Testung von Bakteriendetektionsverfahren"

02/2004 – 04/2004

BASF AG, Ludwigshafen in der Abteilung Polymerforschung, Polyelektrolyte, Screening und Methodenentwicklung mit dem Thema "Untersuchung von Flockungsmechanismen in Papiersystemen"

selbständige Betreuung von Mitarbeitern

06/2007 – 08/2007	8-wöchiges Schnupperpraktikum von Benjamin Grabowski (Abiturient)
03/2008 – 09/2008	Praktikumssemester von Martin Eichmann (Student der Biotechnologie an der Hochschule München)
11/2008 – 04/2009	halbjähriges Praktikum im Rahmen des Praktischen Jahres von Larissa Martin (Pharmazeutin)
03/2009 – 08/2009	halbjähriges Praktikum und Bachelorarbeit von Stefan Dillinger (Student der Biochemie an der Universität Ulm)

Teilnahme an Tagungen während der Dissertation

27.07. – 01.08.2008	33 rd International Herpesvirus Workshop in Estoril, Portugal Poster: "CMV-specific TCR-transgenic T cells for immunotherapy" Vortrag am Betaherpesviruses Satellite Workshop mit dem Thema "EBV/CMV-bispecific T cells for immunotherapy"
26. – 28.05.2008	DFG SFB-TR36 Symposium "Adoptive T cell Therapy" in Berlin Poster: "CMV-specific TCR-transgenic T cells for immunotherapy"
11. – 12.03.2009	SFB-TR36 Spring Meeting in München Vortrag: "EBV/CMV-bispecific T-cells for immunotherapy"
02.04.2009	"interact" PhD Symposium in München Poster: "CMV-specific TCR-transgenic T cells for Immunotherapy"
19. – 20.11.2009	International Symposium on Immunotherapy and Immunodeficiency in Heidelberg

Publikationen

Schub, A., Schuster, I. G., Hammerschmidt, W., Moosmann, A. CMV-specific TCR-transgenic T cells for immunotherapy. J. Immunol. 2009 Nov 15; 183(10):6819-30.

Liang, X., Weigand, L. U., Schuster, I. G., Eppinger, E., van der Griendt, J. C., Schub, A., Leisegang, M., Sommermeyer, D., Anderl, F., Han, Y., Ellwart, J., Moosmann, A., Busch, D. H., Uckert, W., Peschel, C., Krackhardt, A. M. A single T cell receptor (TCR) α -chain with dominant peptide recognition in the allo-restricted HER2/neu-specific T cell repertoire. J. Immunol. 2010 Feb 1;184(3):1617-29.

Schub, A., Dillinger, S., Martin, L., Moosmann, A. Target antigens of the HHV-6-specific CD8⁺ T-cell response. In preparation.

Forschungsantrag

Moosmann, A., Schub, A., Hammerschmidt, W. Antrag auf Förderung eines Forschungsprojekts durch die Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e.V. zu dem Thema "Analyse der Kreuzreaktivität CMV-spezifischer CD8-T-Zellen mit Alloantigenen" (beantragt Oktober 2008, genehmigt Juni 2009)